

***Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung  
humaner Tyrosin-sulfatierter Peptide***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Jennifer Michevec

aus Duisburg  
Dezember 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Strukturelle und Medizinische Biochemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer
2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Willbold
3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hemmo Meyer

Tag der mündlichen Prüfung:

25. Februar 2016

*„Wer in die Fußstapfen anderer tritt,  
kann nie als erster ankommen“*

(schwedisches Sprichwort)

*Für meine Familie*



# INHALTSVERZEICHNIS

## ***Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung humaner Tyrosin-sulfatierter Peptide***

Abkürzungsverzeichnis.....	8
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
1 EINLEITUNG.....	13
1.1 Die Sulfatierung von Tyrosinen.....	13
1.2 Tyrosin-Sulfatierung am Beispiel einer Virus-Rezeptor-Interaktion .....	15
1.2.1 Das Virus: HIV-1 .....	15
1.2.2 Der Rezeptor: CCR5.....	17
1.3 Tyrosin-Sulfatierung am Beispiel eines antimikrobiellen Speichel-Peptids .....	20
1.3.1 Histatine.....	20
1.3.2 Histatin1.....	25
1.4 Zielsetzung .....	27
2 MATERIALIEN & METHODEN.....	30
2.1 Materialien .....	30
2.1.1 Chemikalien.....	30
2.1.2 Peptide.....	32
2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide .....	32
2.1.4 Antibiotika.....	33
2.1.5 Enzyme .....	34
2.1.6 Zelllinien.....	34
2.1.7 Nährmedien .....	34
2.1.8 Puffer und Lösungen .....	35
2.1.9 Marker .....	37
2.1.10 Kits.....	38
2.1.11 Verbrauchsmaterialien .....	39
2.1.12 Geräte .....	39
2.1.13 Software.....	40
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.2.2 DNA-Isolation und Reinigung.....	41
2.2.3 DNA-Amplifikation (PCR).....	41
2.2.4 Klonierung .....	46
2.2.5 Zielgerichtete Mutagenese .....	47
2.2.6 DNA-Transformation.....	48

2.3	Mikrobiologische Methoden .....	48
2.3.1	Kultivierung .....	48
2.3.2	Expression .....	49
2.3.3	Toxizitäts-Assay .....	50
2.3.4	Wundheilungs-Assay .....	51
2.4	Biochemische Methoden .....	51
2.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	51
2.4.2	Zellaufschluss .....	53
2.4.3	Protein-Reinigung .....	53
2.4.4	Analytische Gelfiltration .....	55
2.4.5	Ribosomen-Display .....	55
2.5	Biophysikalische Methoden .....	56
2.5.1	NMR-Spektroskopie .....	56
2.5.2	Fluoreszenz-Anisotropie-Assay .....	59
2.6	Analytische und Chemische Methoden .....	60
2.6.1	Photometrische Konzentrations-Bestimmung .....	60
2.6.2	Festphasen-Peptid-Synthese (SPPS) .....	60
2.6.3	LC-Massenspektrometrie .....	61
2.6.4	Präparative <i>Reversed-Phase</i> -HPLC .....	62
3	ERGEBNISSE .....	63
I	Identifikation von CCR5-Bindern .....	63
3.1	Entwicklung der Display-Komponenten .....	63
3.1.1	Design der Protein-Bibliothek .....	63
3.1.2	Synthese der Ziel-Peptide .....	65
3.2	Selektion und Identifikation bindender Mutanten .....	69
3.2.1	Erzeugung Display-fähiger Bibliotheks-Konstrukte .....	69
3.2.2	Auswahl bindender Mutanten .....	72
3.3	Expression und Untersuchung ausgewählter Mutanten .....	74
3.3.1	Erstellung von Expressions-Konstrukten der Mutanten .....	74
3.3.2	Expression und Reinigung der Mutanten .....	76
3.3.3	Untersuchung der Bindungs-Affinität von Mutanten und Ziel-Peptid .....	78
II	Charakterisierung von Histatin1 .....	81
3.1	Klonierung von Histatin1 .....	81
3.2	Expression und Reinigung von Histatin1 .....	82
3.2.1	Optimierung der Expressionsbedingungen für das Histidin- <i>tag-SUMO</i> -Histatin1 .....	82
3.2.2	Etablierung der Reinigung von Histatin1 .....	83
3.3	Strukturelle Charakterisierung von Histatin1 .....	85
3.3.1	NMR-spektroskopische Analyse der Struktur von Histatin1 .....	86
3.3.2	Untersuchung einer möglichen Multimerisierung von Histatin1 .....	90

3.4	Funktionelle Charakterisierung von Histatin1 .....	94
3.4.1	Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von Histatin1.....	94
3.4.2	Untersuchung der Wundheilungs-Eigenschaften von Histatin1.....	98
4	DISKUSSION .....	102
I	Identifikation von CCR5-Bindern.....	102
4.1	Die Spezifität der identifizierten Binder .....	102
4.1.1	Mutante-1 ist ein Sequenz-spezifischer Binder für IN <sub>S</sub> YYTSA und INYYTSA.....	102
4.1.2	Mutante-2 ist in der Lage zwischen IN <sub>S</sub> YYTSA und INYYTSA zu diskriminieren .....	104
4.2	Die Wahl von <i>Scaffold</i> , Ziel-Peptid und Display-Methode .....	105
4.2.1	Die WW-Domäne von hPin1 als Alternative zur IRS1-PTB-Domäne.....	105
4.2.2	Das Ziel-Peptid CCR5 <sup>9-18</sup> als Alternative zum Ziel-Peptid CCR5 <sup>12-18</sup> .....	106
4.2.3	Das DNA-basierte CIS-Display als Alternative zum Ribosomen-Display .....	107
II	Charakterisierung von Histatin1 .....	108
4.3	Die Struktur von Histatin1 in hydrophiler Umgebung.....	109
4.3.1	Histatin1 ist in hydrophiler Umgebung ein monomeres $\alpha$ -helikales Peptid ..	109
4.3.2	Histatin1 liegt in wässriger Lösung in einem <i>cis</i> - zu <i>trans</i> -Verhältnis von 1:2 vor .....	112
4.4	Die antifungale Aktivität von Histatin1 .....	114
4.4.1	Die Aktivität von rekombinantem und synthetischem Histatin1 gegen <i>S. cerevisiae</i> ist gestaffelt konzentrationsabhängig.....	114
4.4.2	Das N-terminale Fragment EKRHHGYRRKFH aus Histatin1 besitzt vollständige antifungale Aktivität.....	115
4.5	Die Wundheilungs-Eigenschaften von Histatin1 .....	117
4.5.1	Rekombinantes und synthetisches Histatin1 besitzen analoge Wundheilungs-Eigenschaften.....	117
4.5.2	Die Wundheilungs-Eigenschaft der minimal aktiven Domäne von Histatin1 steigt bei Tyrosin-Sulfatierung.....	118
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	120
	Literaturverzeichnis .....	120
	Anhang.....	130
	Danksagung .....	141
	Lebenslauf.....	142
	Erklärungen.....	143

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(v/v)	<i>volume per volume</i>
Å	Angström
ad	<i>adjusted</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C-Terminus/-terminal	Carboxyl-Terminus/-terminal
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
dd	doppelt destilliert
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	<i>free induction decay</i>
h	Stunden
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	kilo-Dalton
KO	Kontrolle
L	Liter
M	Molar (mol/L)
min	Minuten
μ	mikro
mM	Millimolar (mmol/L)
N	Stickstoff
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus/-terminal	Amino-Terminus/-terminal
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
OD	optische Dichte
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
ÜN	über Nacht
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1 Post-translationale Tyrosin-Sulfatierung [17] .....	14
Abbildung 1.2 Aufbau von HIV-1 [51] .....	16
Abbildung 1.3 Mechanismus des HIV-Zelleintritts [63] .....	17
Abbildung 1.4 Sequenz des N-Terminus des CCR5 [89] .....	19
Abbildung 1.5 Aminosäuresequenz der 12 Histatine im menschlichen Speichel, modifiziert nach [105] .....	21
Abbildung 1.6 Schema des Mechanismus zur antifungalen Aktivität der Histatine, modifiziert nach [138] .....	22
Abbildung 1.7 Schema des Mechanismus zur Wundheilungs-Eigenschaft der Histatine, modifiziert nach [138] .....	24
Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des Histatin1-codierenden Gens [138] .....	25
Abbildung 1.9 Die Sequenz von Histatin1 mit ihren funktionellen Bereichen, modifiziert nach [138] .....	26
Abbildung 2.1 Verwendete DNA-Marker .....	38
Abbildung 2.2 Verwendete Protein-Marker .....	38
Abbildung 2.3 Ablauf des Ribosomen-Displays, nach [194] .....	55
Abbildung 3.1 Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit den zu mutierenden Aminosäuren, modifiziert nach [209] .....	64
Abbildung 3.2 Sequenz der IRS1-PTB-Domäne und der daraus hervorgehenden Protein-Bibliothek .....	64
Abbildung 3.3 Diagramm des Massen-Spektrums von IN <sub>s</sub> YYTSA-OH .....	66
Abbildung 3.4 Diagramm des Massen-Spektrums von INYYTSA-OH .....	67
Abbildung 3.5 HPLC-Chromatogramm und LC-MS-Spektrum von MANT-IN <sub>s</sub> YYTSA-OH .....	68
Abbildung 3.6 HPLC-Chromatogramm und LC-MS-Spektrum von MANT-INYYTSA-OH .....	68
Abbildung 3.7 Gen-Abschnitt des für die Protein-Bibliothek codierenden pET41a(+)-Vektors .....	70
Abbildung 3.8 Amplifikation des DNA-Konstrukts .....	71
Abbildung 3.9 Mutationen bei der Überprüfung der Bibliotheks-Diversität .....	71
Abbildung 3.10 Mutationen der selektierten Binder .....	72
Abbildung 3.11 Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit den Mutationen der selektierten Binder .....	73
Abbildung 3.12 Sequenzen der ausgewählten Mutanten .....	74
Abbildung 3.13 Amplifikation der IRS1-PTB und Mutante-1 .....	75
Abbildung 3.14 Proteinnachweis nach dem Expressionstest von GST-tag-IRS1-PTB .....	76
Abbildung 3.15 Verlauf der Reinigung der rekombinanten IRS1-PTB-Domäne .....	77
Abbildung 3.16 Nachweis der Etappen der Reinigung der IRS1-PTB-Domäne .....	78
Abbildung 3.17 Diagramme der Anisotropie-Messung von GST und der IRS1-PTB-Domäne .....	79
Abbildung 3.18 Diagramm der Anisotropie-Messung von Mutante-1 .....	79
Abbildung 3.19 Diagramm der Anisotropie-Messung von Mutante-2 .....	80
Abbildung 3.20 Diagramm der Anisotropie-Messung von Mutante-3 .....	80
Abbildung 3.21 Amplifikation von Histatin1 aus dem Vektor pEX-A2 .....	82
Abbildung 3.22 Proteinnachweis nach dem Expressionstest von His-SUMO-Histatin1 .....	83
Abbildung 3.23 Verlauf der Reinigung von rekombinantem Histatin1 .....	84
Abbildung 3.24 Nachweis der Etappen der Reinigung von Histatin1 .....	85
Abbildung 3.25 Sequenzabhängige Sekundärstrukturvorhersage für Histatin1 .....	86

Abbildung 3.26 Ramachandran-Plot des Histatin1-Ensembles .....	87
Abbildung 3.27 Die Struktur von Histatin1.....	88
Abbildung 3.28 H $\beta$ -H $\delta$ - und H $\gamma$ -H $\delta$ -Kopplungen von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Prolin 25 .....	88
Abbildung 3.29 HN-H $\alpha$ -Kopplungen von Phe26 bis Ser32 in <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Form .....	89
Abbildung 3.30 Überlagerung des <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-SOFAST-HMQC von rekombinantem und synthetischem Histatin1 .....	90
Abbildung 3.31 Ermittelte T <sub>1</sub> -Zeiten für Histatin1 .....	91
Abbildung 3.32 Ermittelte T <sub>2</sub> -Zeiten für Histatin1 .....	91
Abbildung 3.33 Relation der Rotationskorrelationszeit von Histatin1 zu denen bekannter Proteine [218,219].....	92
Abbildung 3.34 Chromatogramme der analytischen Größenausschlusschromatographie.....	92
Abbildung 3.35 Auswertung der konzentrationsabhängigen analytischen Größenausschlusschromatographie.....	93
Abbildung 3.36 Zellzahlen von <i>S. cerevisiae</i> nach 1 h und 3 h Peptid-Inkubation .....	95
Abbildung 3.37 Inhibition des Wachstums von <i>S. cerevisiae</i> nach 1 h und 3 h Peptid-Inkubation.....	95
Abbildung 3.38 Einfluss des rekombinanten Histatin1 auf das Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> .....	96
Abbildung 3.39 Einfluss des synthetischen Histatin1 auf das Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> .....	96
Abbildung 3.40 Einfluss des N-terminalen Histatin1 auf das Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> .....	97
Abbildung 3.41 Konzentrationsabhängiger Verlauf der Wachstums-Inhibition von <i>S. cerevisiae</i> unter Anwesenheit von Histatin1-Varianten.....	97
Abbildung 3.42 Wundheilung unter Anwesenheit von rekombinantem und synthetischem Histatin1 .....	99
Abbildung 3.43 Wundschließung nach Inkubation mit Histatin1-Varianten .....	99
Abbildung 3.44 Wundheilung unter Anwesenheit des C-terminalen Fragments von Histatin1 in nicht-sulfatierter und sulfatierter Variante .....	100
Abbildung 3.45 Konzentrationsabhängiger Verlauf der prozentualen Wundheilung von <i>TR146</i> -Zellen unter Anwesenheit von Histatin1-Varianten .....	100
Abbildung 3.46 Heilungszuwachs bei Inkubation mit Histatin1-Varianten .....	101
Abbildung 4.1 Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit den Mutationen aus Mutante-1.....	103
Abbildung 4.2 Vergleich der Aminosäure-Position 221 in Mutante-1 und -2 .....	104
Abbildung 4.3 Die WW-Domäne von hPin1 als <i>Scaffold</i> .....	106
Abbildung 4.4 Prinzip des CIS-Displays [234].....	107
Abbildung 4.5 Alignment von Histatin1 und Histatin5, modifiziert nach [136] .....	109
Abbildung 4.6 Grenzstrukturen von Histatin1 .....	110
Abbildung 4.7 Strukturen von Histatin5 [108] .....	111
Abbildung 4.8 Modell der <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von Histatin1 .....	113
Abbildung 4.9 Struktur der Sequenz EKRHHGYKFH aus Histatin1 .....	116
Abbildung 4.10 Oberflächenladung von Histatin1 bei Tyrosin-Sulfatierung .....	119

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien.....	30
Tabelle 2.2 Peptid-Synthese-Bausteine .....	32
Tabelle 2.3 Eingesetzte Peptide.....	32
Tabelle 2.4 Verwendete Konstrukte .....	33
Tabelle 2.5 Verwendete Oligonukleotide.....	33
Tabelle 2.6 Verwendete Enzyme .....	34
Tabelle 2.7 Verwendete Bakterienstämme .....	34
Tabelle 2.8 Verwendete Medien.....	35
Tabelle 2.9 Verwendete Puffer und Lösungen .....	35
Tabelle 2.10 Verwendete Kits.....	38
Tabelle 2.11 Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	39
Tabelle 2.12 Verwendete Geräte .....	39
Tabelle 2.13 Verwendete Software .....	40
Tabelle 2.14 PCR-Bestandteile für PCR I .....	42
Tabelle 2.15 PCR-Bestandteile für PCR II .....	42
Tabelle 2.16 PCR-Programm für PCR I und PCR II .....	42
Tabelle 2.17 PCR-Bestandteile für die Fusions-PCR .....	43
Tabelle 2.18 PCR-Programm für die Fusions-PCR .....	43
Tabelle 2.19 PCR-Bestandteile für die Amplifikation der cDNA aus dem Ribosomen-Display .....	43
Tabelle 2.20 PCR-Bestandteile für die Amplifikation des IRS1-PTB- <i>Wildtyps</i> und Mutante-1 .....	44
Tabelle 2.21 PCR-Programm für die Amplifikation des IRS1-PTB- <i>Wildtyps</i> und Mutante-1 .....	44
Tabelle 2.22 PCR-Bestandteile für die Amplifikation von Histatin1 .....	45
Tabelle 2.23 PCR-Programm für die Amplifikation von Histatin1.....	45
Tabelle 2.24 PCR-Bestandteile für die Amplifikation des <i>TOPO</i> -Vektors.....	45
Tabelle 2.25 PCR-Programm für die Amplifikation des <i>TOPO</i> -Vektors.....	46
Tabelle 2.26 Restriktions-Ansatz zur Klonierung der IRS1-PTB sowie Mutante-1 .....	46
Tabelle 2.27 Ligations-Ansatz zur Klonierung der IRS1-PTB sowie Mutante-1.....	46
Tabelle 2.28 Restriktions-Ansatz zur Klonierung von Histatin1 .....	47
Tabelle 2.29 Ligations-Ansatz zur Klonierung von Histatin1.....	47
Tabelle 2.30 <i>Quick-Change</i> -Ansatz zur Generierung von Mutante-2 und -3.....	48
Tabelle 2.31 Zusammensetzung des 12,5%igen SDS-Gels.....	52
Tabelle 2.32 Zusammensetzung des Tris/Tricin-Gels.....	52
Tabelle 2.33 Protokoll der Reinigung von GST-IRS1-PTB sowie GST-Mutante-1 bis -3 .....	53
Tabelle 2.34 Protokoll der Reinigung von Histatin1 .....	54
Tabelle 2.35 Proteine und Substanzen des Kalibrationslaufs der analytischen <i>SEC</i> .....	55
Tabelle 2.36 Parameter der verwendeten NMR-Spektren .....	57
Tabelle 2.37 Parameter zur Fluoreszenz-Anisotropie-Messung .....	59
Tabelle 3.1 Übersicht über die Peptid-Varianten der Sequenz des CCR5 <sup>12-18</sup> .....	65
Tabelle 3.2 Übersicht der für die Erzeugung der Bibliothek verwendeten Primer .....	70
Tabelle 3.3 Zusammenstellung der selektierten Mutanten .....	73

Tabelle 3.4 Sequenzen der Mutagenese-Primer für Mutante-2 und Mutante-3.....	75
Tabelle 3.5 Übersicht über die Kenn-Werte der Fluoreszenz-Anisotropie-Assays.....	81
Tabelle 3.6 Statistik des mit <i>Cyana 2.1</i> errechneten Ensembles aus 10 Histatin1-Strukturen.....	86
Tabelle 3.7 Verhältnis von <i>trans</i> - zu <i>cis</i> -Isomer für Phe26 bis Ser32 .....	89
Tabelle 3.8 Zusammenstellung der Ergebnisse der analytischen Größenausschlusschromatographie von Histatin1 .....	93
Tabelle 3.9 Übersicht über die eingesetzten Varianten von Histatin1 .....	94
Tabelle 3.10 Übersicht über den Heilungszuwachs bei Inkubation mit Histatin1-Varianten [in %].....	101



# 1 EINLEITUNG

Die Gesamtzahl der Proteine im Menschen ist zwei- bis dreimal größer als die Gesamtzahl seiner Gene vermuten lassen würde. Dieser Effekt ist unter anderem auf eine Vielzahl von Veränderungen zurückzuführen, welche nach Transkription der DNA und Translation der RNA am resultierenden Protein vorgenommen werden und dementsprechend als post-translationale Modifikationen bekannt sind.

In den Worten von *Walsh et al.* [1] und *Prabakaran et al.* [2] entspricht dieser Vorgang einem Ausbau des Inventars der Natur oder anders gesagt ihrem Ausbruch aus genetischer Gefangenschaft.

## 1.1 Die Sulfatierung von Tyrosinen

---

Die post-translationale Verknüpfung eines anorganischen Sulfats mit der Alkoholgruppe eines Tyrosyl-Rests ist eine weitverbreitete Protein-Modifikation, die in einer Vielzahl biologischer Prozesse eine wichtige Rolle übernimmt. Diese Tyrosin-Sulfatierung wurde bisher nur für sekretierte Proteine und extrazelluläre Teile von Membran-Proteinen beobachtet, wobei insbesondere Plasmamembran- und lysosomale Proteine aber auch alle weiteren, den Golgi-Apparat passierenden, Proteine betroffen sind. Dagegen erhalten Proteine aus dem Kern sowie dem Cytoplasma keine Sulfat-Reste [3–5].

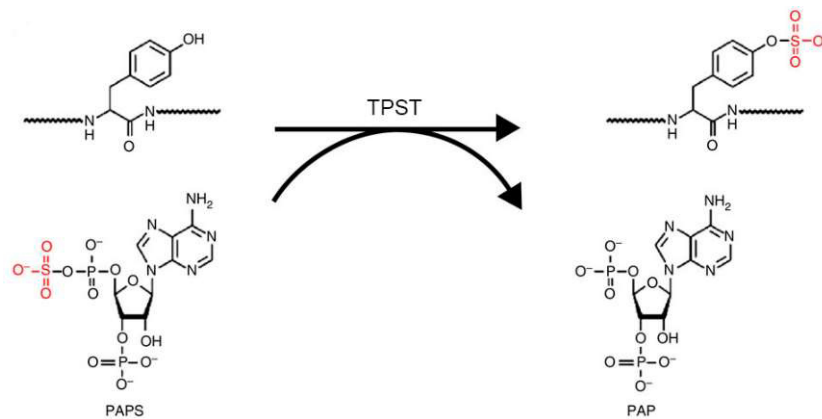
Die erste post-translationale Sulfatierung eines Tyrosins wurde in einem Peptid des Rinder-Fibrinogens B entdeckt [6]. Inzwischen ist das Auftreten dieser Modifikation für viele Proteine aus mehrzelligen eukaryotischen Organismen bekannt [5,7]. Allerdings scheint der Anteil an bekannten sulfatierten Proteinen mit insgesamt 1 % aller Tyrosyl-Reste im eukaryotischen Genom unter den Möglichkeiten der Tyrosin-Sulfatierung zu bleiben. So werden beispielsweise für das menschliche Proteom rund 4600 sulfatierte Proteine vorhergesagt, was in diesem Fall einem Anteil von knapp 13 % entsprechen würde [8–10]. Dabei basiert die Vorhersage nicht alleine auf sequenziellen Merkmalen der entsprechenden Proteine. Für eine potenzielle Sulfatierung ist es zudem erforderlich, dass der Transport des Proteins in den Golgi-Apparat gewährleistet ist, da sich dort die verantwortlichen Sulfotransferasen befinden.

Die Familie der Sulfotransferasen umfasst drei wesentliche Klassen von Enzymen, die jeweils für den Transfer eines aktivierten Sulfats auf unterschiedliche Biomoleküle zuständig sind. Dabei besteht das aktivierte Sulfat aus einem Phospho-Sulfat-Anhydrid. Dieses wird im Menschen mithilfe der bifunktionalen PAPS-Synthetase, bestehend aus ATP-Sulfurylase und APS-Kinase, in Form des 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfats (PAPS) zur Verfügung gestellt wird. Somit fungiert PAPS als universeller Sulfat-Donor in Sulfotransferase-Reaktionen [11]. Im Falle der post-translationalen Sulfatierung von Tyrosinen ist die Enzym-Klasse der Tyrosylprotein-

Sulfotransferasen (TPSTs) für den Sulfat-Transfer verantwortlich. Es handelt sich dabei um Membran-assoziierte Glykoproteine, welche im *trans*-Golgi-Komplex lokalisiert sind [12].

Im Menschen konnten zwei TPST-Isoformen identifiziert werden, welche sich mit ihren 370 beziehungsweise 377 Aminosäuren insgesamt 63 % ihrer Primär-Sequenz teilen [13–15]. Dabei besitzen TPST-1 und TPST-2 jeweils eine kurze N-terminale cytoplasmatische Domäne, eine 17-Aminosäuren-lange transmembrane Domäne und eine luminal katalytische Domäne. Letztere befindet sich im Bereich der Aminosäuren 69-352 und weist eine Homologie zwischen den beiden Isoformen von rund 77 % auf. Dennoch bestehen zwischen TPST-1 und -2 in Bezug auf ihre Substrat-Spezifität und die daraus resultierenden physiologischen Funktionen geringfügige Unterschiede [16].

In Bezug auf den Mechanismus der Reaktion zur Tyrosin-Sulfatierung verläuft die Katalyse beider Tyrosylprotein-Sulfotransferasen analog (Abbildung 1.1, nach [17]).



**Abbildung 1.1 Post-translationale Tyrosin-Sulfatierung [17]**

Die Reaktion zur post-translationalen Sulfatierung eines Tyrosins findet unter TPST-Katalyse statt. Die Sulfat-Gruppe des universellen Sulfat-Donors 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) wird auf den Tyrosyl-Rest des Substratproteins unter Bildung eines Tyrosin-Sulfat-Esters sowie 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat (PAP) übertragen.

Das in Form von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat in den Golgi-Apparat transportierte, aktivierte Sulfat wird auf die Hydroxy-Gruppe des Protein-gebundenen Tyrosins übertragen. Dabei bildet sich ein O-Sulfat-Ester sowie 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat (PAP). Zur Erkennung der entsprechenden Tyrosyl-Reste durch die TPSTs sind dabei im Bereich von  $\pm 5$  Aminosäuren zugängliche, saure Seitenketten erforderlich [18–20]. So zeigten Studien, dass der Austausch von Glutamin- oder Asparaginsäure in diesem Bereich eine verminderte TPST-Aktivität mit sich bringt [21]. Zudem wird die Tyrosin-Sulfatierung durch eine ungeordnete Struktur des Proteins begünstigt, da der entsprechende Bereich Lösungsmittel-zugänglich ist und durch seine Flexibilität in die Bindungstasche der jeweiligen TPST passt [22].

Tyrosin-sulfatierte Proteine nehmen an einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen teil, die nicht zuletzt durch die Erkennung der Sulfat-Gruppe selbst angetrieben werden [23]. So wurden sulfatierte Tyrosine in Proteinen nachgewiesen, die an der Blutgerinnung [24–29] oder der Entzündungsbekämpfung [30,31] beteiligt sind. Zudem sind sulfatierte Proteine auch in die

Bindung verschiedener Rezeptoren und Liganden [32–40] sowie in Protein-Interaktionen in der extrazellulären Matrix [41,42] involviert.

Im Folgenden wird nun auf zwei Beispiele von Tyrosin-Sulfatierungen im humanen System detailliert eingegangen, wobei sowohl ein transmembranes als auch ein sekretiertes Protein vorgestellt werden. Ersteres ist in Form des CCR5-Corezeptors an der Interaktion des HI-Virus mit der Wirts-Zellmembran beteiligt und leistet so einen direkten Beitrag zum viralen Zelleintritt. Dabei wird die Bindung der Oberflächen-Proteine des Virus durch die Sulfatierung der Tyrosyl-Reste im N-Terminus des Rezeptors bedingt. Dagegen handelt es sich bei dem zweiten Protein um Histatin1, welches als antimikrobielles Peptid aus dem menschlichen Speichel sowohl antifungale Aktivität als auch Wundheilungs-Eigenschaften besitzt. Interessanterweise ist dieses in der Gruppe der Histatine das einzige Mitglied, für das Tyrosin-Sulfatierungen nachgewiesen werden konnten.

## 1.2 Tyrosin-Sulfatierung am Beispiel einer Virus-Rezeptor-Interaktion

---

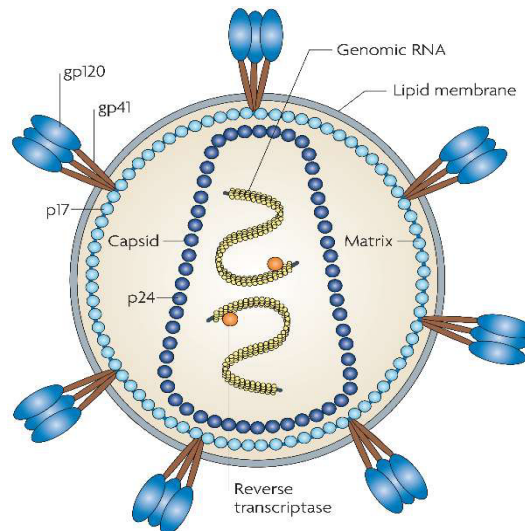
Das erworbene Immunschwäche-Syndrom (AIDS, *acquired immune deficiency syndrome*) ist eine Infektionskrankheit, die eine schrittweise Zerstörung des Immunsystems bewirkt. Sie wird durch das Humane Immunschwäche-Virus (HIV, *human immune deficiency virus*) ausgelöst und beruht auf der Zerstörung von CD4-positiven T-Lymphozyten [43–46]. Der Zelleintritt des Virus wird dabei durch die Interaktion der viralen Hüllproteine mit den Oberflächen-Proteinen der Wirtszelle ermöglicht. Dies erfordert das Zusammenspiel des CD4-Rezeptors mit einem Co-Rezeptor, welcher entweder durch den CXC-Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4) oder den CC-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5) repräsentiert wird.

### 1.2.1 Das Virus: HIV-1

Das Humane Immunschwäche-Virus ist ein Mitglied der Familie der *Retroviridae* und zählt zur Gattung der Lentiviren. Es wird aufgrund phylogenetischer und biologischer Eigenschaften in HIV-1 und HIV-2 unterteilt, wobei der Unterschied zwischen den Virus-Typen auf Nukleotid-Ebene in einem Bereich von 40-60 % liegt [47]. Entsprechend der daraus resultierenden unterschiedlichen Pathogenität der beiden, ist HIV-1 mit der Verantwortung für 99 % der HIV-Infektionen der deutlich relevantere Virus-Typ [48,49].

HIV-1 besitzt wie alle Retroviren ein einzelsträngiges RNA-Genom (ssRNA), welches durch die viruseigene Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgeschrieben und mithilfe der viruseigenen Integrase in das Wirtsgenom integriert werden kann [50]. Dies ermöglicht die gemeinsame Replikation und Expression der viralen DNA mit der Erbinformation der Wirtszelle. Die daraus hervorgehenden viralen Proteine lagern sich an der Plasma-Membran an und gewährleisten durch Interaktion mit der viralen genomischen RNA die Inkorporation des Virus-Genoms in die entstehenden Virus-Partikel. Die noch unreifen Virus-Partikel knospen über die

Plasmamembran und schnüren sich schließlich von der Wirtszelle ab. Dies resultiert in der Bildung eines neuen Virions, welches einen identischen Aufbau wie das vorherige besitzt (Abbildung 1.2, nach [51]).

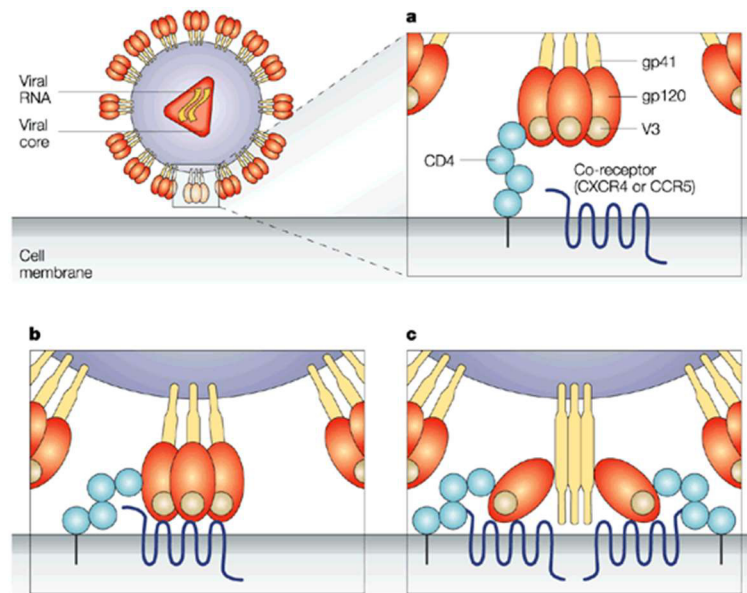


**Abbildung 1.2 Aufbau von HIV-1 [51]**

Dargestellt ist der schematische Aufbau eines HI-Virions. Das aus p24-Proteinen bestehende Capsid umschließt zwei Kopien des RNA-Genoms. Die äußere Hülle besteht aus einer Lipid-Doppelschicht-Membran, welche die Hüllproteine gp41 und gp120 enthält.

Die äußere Hülle des Virions besteht aus einer Lipid-Doppelschicht-Membran, welche von der Wirtszelle adaptiert wurde. Sie enthält mehrere trimere gp120-gp41-Komplexe, wobei das transmembrane Glykoprotein gp41 mit dem peripheren Hüll-Glykoprotein gp120 nicht-kovalent assoziiert ist [52]. Der zum Virus-Inneren gerichtete Teil von gp41 interagiert mit den p17-Matrixproteinen, welche die Innenseite der Membran auskleiden und für die strukturelle Instandhaltung verantwortlich sind [53]. Sie bilden eine Proteinhülle, die das aus p24-Proteinen bestehende Capsid umschließt. Dieses enthält zwei Kopien des RNA-Genoms sowie die für eine Replikation unverzichtbaren Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease [54,55]. Die Hüll-Glykoproteine gp120 und gp41 sind die einzigen vom Virus codierten Determinanten, die sich auf der Virus-Oberfläche befinden und sind daher für den viralen Adsorptionsprozess verantwortlich. Dabei vermittelt das außen liegende gp120 die Rezeptor-Bindung, während das integrale gp41 den viralen Zelleintritt in die Wege leitet.

Der erste Kontakt des Virus mit der Wirts-Zellmembran findet über die Bindung des gp120-Oberflächenproteins an den CD4-Rezeptor statt [56]. Dies bewirkt einen Konformations-Wechsel in der Virus-Struktur, wodurch das gp41-Oberflächenprotein offenbart und die Bindung an einen Chemokin-Corezeptor auf der Wirtszell-Oberfläche ermöglicht wird [57]. Bei diesem Corezeptor handelt es sich entweder um den CCR5 oder den CXCR4, wobei der Virus entsprechend seiner Bindungs-Fähigkeit als R5- oder X4-tropisch bezeichnet wird [58–62]. Die Corezeptor-Bindung schließlich ist der entscheidende Schritt für die Kontaktaufnahme des Virus mit der Wirts-Zellmembran (Abbildung 1.3, nach [63]).



**Abbildung 1.3 Mechanismus des HIV-Zelleintritts [63]**

Während des viralen Adsorptionsprozesses findet zunächst eine Interaktion zwischen dem viralen Hüllprotein gp120 und dem CD4-Rezeptor auf der Zellmembran statt (a). Anschließend interagiert der gebildete gp120/CD4-Komplex mit dem Corezeptor CCR5 (b), wodurch schließlich die Verankerung des gp41-Proteins in der Zellmembran des Wirts ermöglicht wird (c).

Der Kontakt zwischen Virus und Zellmembran ermöglicht die Verankerung des gp41-Oberflächenproteins [64,65]. Dies erleichtert die Fusion der viralen und der zellulären Membran und führt letztendlich zum Zelleintritt des Virus.

### 1.2.2 Der Rezeptor: CCR5

Der CC-Chemokin-Rezeptor-5 gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Er wird vor allem von T-Effektor- und natürlichen Killerzellen, aber auch von Makrophagen, Monozyten, unreifen dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen exprimiert [66]. Seine natürliche Aufgabe besteht in der Erkennung und Bindung der Chemokine CCL3 (MIP1- $\alpha$ ), CCL4 (MIP1- $\beta$ ), CCL5 (RANTES) und CCL8 (MCP-2). Dabei wird mithilfe der G-Proteine das Immunsystem stimuliert und die Produktion von Antikörpern angeregt. Zudem löst die Chemokin-Bindung eine Wanderung der Zellen aus, die sich daraufhin in die Richtung der höchsten Chemokin-Konzentration bewegen (Chemotaxis). So wird die CCR5-Expression in CD8-positiven Zellen (T-Killerzellen) während einer Entzündung hoch-reguliert, so dass diese in Richtung von CD4-positiven Zellen (T-Helferzellen) wandern können [67,68]. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden Antigen-spezifischer Zellen und führt damit zu einer Verbesserung der adaptiven Immunantwort.

Während der initialen HIV-Infektion dominieren R5-trope Viren, welche somit den CCR5 als Corezeptor verwenden. Mit Ausbruch der Krankheit AIDS wechselt der Tropismus jedoch zu X4, so dass bevorzugt der CXCR4 für den Zelleintritt verwendet wird. Dementsprechend konnte bei dem Versuch, eine Interaktion des Virus mit der Zellmembran zu verhindern, zumindest für das

frühe Stadium der Infektion gezeigt werden, dass ein Zelleintritt durch die natürlichen Liganden des CCR5-Rezeptors inhibiert werden kann [61].

#### 1.2.2.1 Die Struktur des CCR5

Das CCR5-Protein besteht aus 352 Aminosäuren und besitzt wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ein Sieben-Helix-Transmembran-Motiv [69]. Dieses setzt sich zusammen aus sieben transmembranen Domänen (TMD1-7), drei extrazellulären (ECL1-3) und drei intrazellulären *Loops* (ICL1-3) sowie einem extrazellulären N- und einem cytoplasmatischen C-Terminus.

Entsprechend der GPCR-Struktur-Charakteristik besitzt der CCR5-Rezeptor eine konservierte Disulfid-Brücke zwischen ECL1 und ECL2 [70–73]. Zusätzlich befindet sich ein weiteres Cystein im N-Terminus des Proteins, welches mit ECL3 eine Disulfid-Brücke ausbilden und so eine Stabilisierung des Rezeptors bewirken kann. Es konnte gezeigt werden, dass eine Substitution der Cysteine die Zelloberflächen-Expression des CCR5 um 40-70 % vermindert [66]. Zudem scheinen die Disulfid-Brücken für die Liganden-Bindung wichtig zu sein [72].

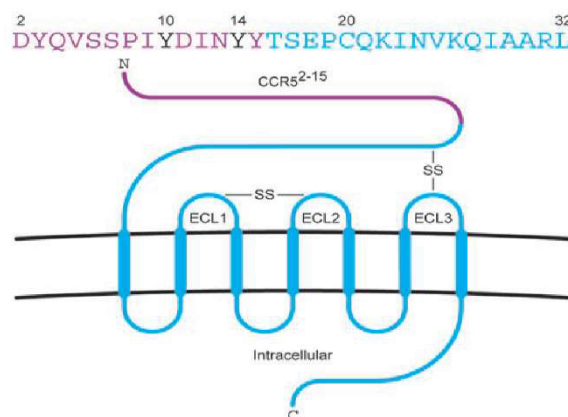
Neben den konservierten Cysteinen besitzt der CCR5 weitere spezifische Motive, die für eine stabile Rezeptor-Konformation und die Chemokin-Bindung sowie für die HIV-Corezeptor-Aktivität notwendig sind. Dies betrifft vor allem Gruppen von geladenen oder hydrophoben Aminosäuren, aber auch post-translationale Modifikationen im N- und C-Terminus. So unterliegen die Cysteine an Position 321, 323 und 324 einer Palmitoylierung. Dabei kann es durch nachfolgende Insertion der Fettsäure-Anker in die Zellmembran zur Ausbildung eines vierten intrazellulären *Loops* (ICL4) kommen [74]. Dies vereinfacht den Rezeptor-Transport zur Zelloberfläche, beeinflusst die Interaktion zwischen Rezeptor und Signalwegen und ist in die Rezeptor-vermittelte Endozytose involviert [74–76]. Eine Entfernung der Palmitoylierung führt zu einer reduzierten Oberflächenexpression und damit auch zu einer Abnahme der Anzahl der für den HIV-Zelleintritt zur Verfügung stehenden Corezeptoren.

Im N-terminalen Bereich des CCR5-Rezeptors wurde der Abschnitt der Aminosäuren 2-18 als entscheidend für die Liganden- und HIV-Bindung identifiziert [77,78]. Dies betrifft insbesondere die Aminosäuren an Position 2, 11, 17, 18 und 20 sowie die Tyrosine in diesem Bereich. Dabei scheint die post-translationale Sulfatierung eines oder mehrerer dieser Tyrosyl-Reste für die optimale Bindung der natürlichen Liganden CCL3 (MIP1- $\alpha$ ), CCL4 (MIP1- $\beta$ ) und CCL5 (RANTES) sowie für die Corezeptor-Funktion erforderlich zu sein. So zeigten Substitutionsstudien, in denen die Tyrosine im N-Terminus des CCR5 durch Phenylalanine ersetzt wurden, teilweise eine 100-fach geringere Bindungs-Affinität [34,79]. Zudem führte auch die bloße Unterbindung der Tyrosin-Sulfatierung zu einer verminderten Affinität der Liganden sowie des viralen gp120-Hüllproteins. Dementsprechend konnte für gp120 die Fähigkeit zur Erkennung sulfatierter Gruppen nachgewiesen und mithilfe löslicher Sulfat-Verbindungen eine *in vitro* HIV-Infektion inhibiert werden [80–82].

### 1.2.2.2 Die Rolle des CCR5 im HIV-Zelleintritt

Der HIV-Zelleintritt wird durch die sukzessive Wechselwirkung des Hüll-Glykoproteins gp120 mit dem CD4-Rezeptor sowie im Falle R5-troper Stämme dem Chemokin-Corezeptor CCR5 vermittelt. Dabei wird die Corezeptor-Bindungsstelle letztendlich erst aufgrund der Bindung von gp120 an CD4 offenbart [83,84]. Sie besteht aus dem sogenannten *bridging sheet* des gp120, welches aus vier antiparallelen Faltblättern der V1/V2-Schleife gebildet wird und sich während des viralen Absorptionsprozesses direkt neben der flexiblen V3-Schleife befindet [85,86].

Auf Seiten des CCR5-Rezeptors sind vor allem post-translational modifizierte Tyrosine im N-Terminus (AS 2-32) für die Fusion und den viralen Zelleintritt verantwortlich. Dabei kommt jedes der vier Tyrosine an Position 3, 10, 14 und 15 im N-Terminus als mögliche Sulfatierungs-Stelle in Frage. Es konnte jedoch ein spezifisches Modifikations-Muster identifiziert werden, bei dem zunächst Tyrosin 14 oder Tyrosin 15 einer Sulfatierung unterliegen müssen, bevor die anderen beiden modifiziert werden können [87]. In Bezug auf den HIV-Zelleintritt handelt es sich bei dieser initialen Sulfatierungs-Stelle um Tyrosin 14, während sich Tyrosin 15 in Studien zur optimalen Corezeptor-Funktion als gegen Phenylalanin austauschbar zeigte [78]. Dementsprechend genügt im Zuge der Bindung lediglich die hydrophobe Wechselwirkung von gp120 mit der aromatischen Seitenkette. Dagegen kommt die Interaktion mit den drei sulfatierten Tyrosinen nicht aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen zustande, sondern beruht auf der Erkennung der Sulfat-Gruppe selbst. So bewirkte in verschiedenen zum N-Terminus analogen Peptiden der Austausch der Sulfatierung gegen eine Phosphorylierung einen Verlust der Bindungs-Affinität [88]. Des Weiteren konnte mithilfe dieser Peptide auch die Notwendigkeit der Primärsequenz-Intaktheit im Bereich von Aminosäure 2-18 nachgewiesen werden. So konnten weder verkürzte Peptide noch Peptide mit einer zufälligen Abfolge der in dieser Sequenz enthaltenen Aminosäuren eine Corezeptor-Bindung imitieren. Allerdings konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass im Zusammenspiel mit spezifischen Aminosäuren zwischen Position 2 und 18 die sulfatierten Tyrosine 10 und 14 für einen erfolgreichen HIV-Zelleintritt ausreichen (Abbildung 1.4, nach [89]).



**Abbildung 1.4 Sequenz des N-Terminus des CCR5 [89]**

Dargestellt sind die Insertion des CCR5-Rezeptors in der Zellmembran sowie die Sequenz des extrazellulären N-Terminus (AS 2-32). Die schwarz unterlegten Sequenz-Buchstaben entsprechen den für eine HIV-Interaktion unverzichtbaren Tyrosinen 10 und 14.

Während der Bindung des viralen gp120-Hüllproteins an den N-Terminus des CCR5-Rezeptors entwickelt sich zunächst eine ionische Bindung eines Arginins zu Tyrosin 10, während sich Tyrosin 14 in einer Spalte zwischen der V3-Schleife und dem *bridging sheet* befindet. Beide sulfatierten Tyrosine werden dabei von konservierten Taschen der gp120/CD4-Region mit hoher Selektivität umschlossen [89,90]. Durch die zusätzliche Interaktion weiterer Aminosäure-Reste mit der V3-Schleife und der ionischen Bindung eines weiteren Arginins zu Asparagin 11 wird eine Konformations-Änderung des N-Terminus von CCR5 induziert und dadurch die V3-Schleife in räumliche Nähe zu ECL2 gebracht [91]. Dies bewirkt einen Konformations-Wechsel im gp120-Protein, wodurch die gp41-Ektodomäne freigelegt wird [92]. Dabei führt ihre Interaktion mit der Wirts-Zellmembran schließlich zum sofortigen Eintritt des HI-Virus in die Zielzelle.

### 1.3 Tyrosin-Sulfatierung am Beispiel eines antimikrobiellen Speichel-Peptids

---

Der menschliche Speichel ist eine komplexe biologische Flüssigkeit mit einer Vielzahl an physiologischen Funktionen. Er wird durch die Ohr-, Unterkiefer- und Unterzungenspeicheldrüsen sekretiert und enthält neben Wasser und Elektrolyten auch eine Vielzahl an Proteinen und Peptiden [93–95]. Als Teil des körpereigenen Abwehrsystems besteht eine wesentliche Aufgabe dieser Proteine und Peptide in der Regulation der antimikrobiellen Mundhöhlen-Flora, was insbesondere den Schutz vor einer Überwucherung des Hefepilzes *Candida albicans* betrifft. In Studien zur Erhaltung der Mundhöhlen-Intaktheit konnte sich diesbezüglich die Familie der Histatine als Hauptakteur der antifungalen Aktivität des menschlichen Speichels beweisen.

#### 1.3.1 Histatine

Histatine sind eine Familie kleiner, kationischer, Histidin-reicher (18-28 mol%) Peptide mit einer Größe von 7-38 Aminosäuren [94,96]. Ihre Konzentration im menschlichen Speichel wird durch das Gleichgewicht aus der Peptid-Sekretion der Speicheldrüsen und der Proteolyse degradierter Peptide bestimmt und variiert in einem Bereich von 50-425 µM [97].

Die Mutter-Histatine, Histatin1 und Histatin3, werden durch zwei verschiedene Gene im Chromosomen-Abschnitt 4q13 codiert, welche als HTN1 und HTN3 benannt sind [98,99]. Ihre Transkription konnte bisher nur im Menschen und in höheren Primaten nachgewiesen werden und wird insbesondere bei HTN1 durch ein positives regulatorisches Element stimuliert. Post-translational erhält Histatin1 eine Phosphorylierung an Serin 2, während Histatin3 durch eine Mutation von Glutamat 4 zu Alanin die Erkennungs-Sequenz der Kinase verliert und so das Anhängen einer Phosphatgruppe verhindert [100,101]. Dagegen führt eine post-translationale Modifikation der Histatin3-mRNA zur Entstehung eines weiteren Familien-Mitglieds der Histatine, welches als Histatin5 bezeichnet wird [102]. Die restlichen Mitglieder der insgesamt 12-köpfigen Histatin-Familie entstehen durch proteolytische Spaltung von Histatin1 und Histatin3



[100,103,104]. Sie werden systematisch als Histatin2, Histatin4 sowie Histatin6 bis -12 benannt (Abbildung 1.5, modifiziert nach [105]).

```

Hist1  1 DμSHEKRHHGYRRKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN38
Hist2                                RKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN

Hist3  1 DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYR-----SNYLYDN32
Hist4                                RKFHEKHHSHRGYR-----SNYLYDN

Hist5  1 DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY24
Hist6  DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYR
Hist7                                RKFHEKHHSHRGY
Hist8                                KFHEKHHSHRGY
Hist9                                RKFHEKHHSHRGYR
Hist10                               KFHEKHHSHRGYR
Hist11          KRHHGYKR
Hist12          KRHHGYK
    
```

**Abbildung 1.5 Aminosäuresequenz der 12 Histatine im menschlichen Speichel, modifiziert nach [105]**

Die beiden Mutter-Histatine (blau), Histatin1 und Histatin3, sind zusammen mit Histatin5 (schwarz) die wesentlichen Histatine im menschlichen Speichel. Dagegen handelt es sich bei dem Rest um proteolytische Produkte von Histatin1 oder Histatin3.  $\mu$ S beschreibt das post-translational phosphorylierte Serin in Histatin1.

Die drei im menschlichen Speichel dominierenden Histatine sind Histatin1, Histatin3 und Histatin5 und nehmen zusammengenommen einen Anteil von etwa 80 % ein. Sie besitzen mit ihren 38, 32 und 24 Aminosäuren untereinander eine hohe Sequenz-Homologie, so dass bis auf Glutamin 4 und Arginin 11 in Histatin1 die ersten 22 Aminosäuren dieser drei Peptide identisch sind. Zudem besitzen Histatin1 und Histatin3 die gleichen sieben C-terminalen Aminosäuren. In struktureller Hinsicht scheinen die Histatine in wässriger Lösung einen ungeordneten Zustand zu bevorzugen. Für Histatin3 und Histatin5 allerdings konnte bereits eine dreidimensionale Struktur aufgelöst werden [105–107]. Dabei liegen diese in hydrophober Umgebung wie Wasser/Trifluoroethanol oder Wasser/Dimethylsulfoxid in einer vorwiegend  $\alpha$ -helikalen Konformation vor. Diese wird durch Metall-Koordination stabilisiert, was insbesondere für den C-Terminus von Histatin5 unter Anwesenheit von Zink- sowie Nickel-Ionen und negativ geladenen Membranen gezeigt werden konnte [108,109]. Die dazu erforderlichen Metall-Bindungsstellen sind in allen drei Haupt-Histatinen mit dem ATCUN-Motiv (D-X-H) für die Bindung von Cu(II) bzw. Ni(II) und dem HEXXH-Motiv für die Bindung von Zn(II) zu finden [108,110–112]. Dabei ist es möglich, dass diese Metall-Koordination ein ausschlaggebender Faktor für verschiedene auf Konformations-Veränderungen beruhende Interaktionen der Histatine ist.

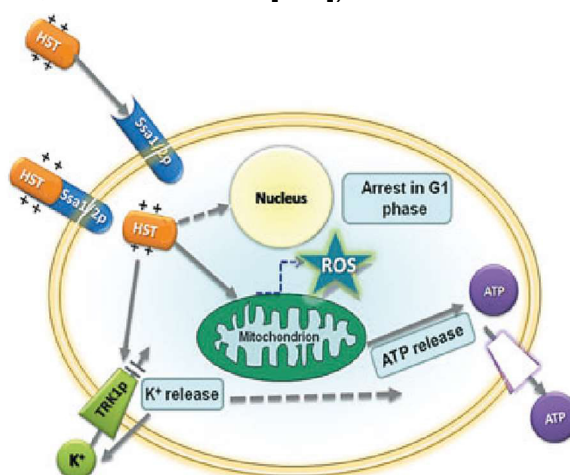
In funktioneller Hinsicht ist die Familie der Histatine mit einer Reihe facettenreicher Eigenschaften ausgestattet. So zeigen sie neben ihrer antimikrobiellen und entzündungshemmenden Aktivität auch eine Beteiligung an der Errichtung des Zahnschmelzes [101,113,114] sowie der Neutralisation von Lipopolysacchariden [115]. Zudem besitzen Histatine die Fähigkeit zur Inhibition von Proteasen [112,116,117] und leisten einen wesentlichen regulatorischen Beitrag in Wundheilungs-Prozessen [118,119].

### 1.3.1.1 Die antimikrobielle Aktivität der Histatine

Die Mundhöhle stellt für eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen eine einladend warme und feuchte Umgebung zur Verfügung. Dementsprechend fällt den Histatinen und ihren homologen Peptiden eine wichtige Rolle im Kampf gegen fungale und bakterielle orale Krankheitserreger zu [120,121].

Die antibakterielle Aktivität der Histatine basiert wie bei vielen anderen antimikrobiellen Peptiden auf einem elektrostatischen Effekt. So findet die erste Interaktion des basischen Peptids mit der Zellmembran aufgrund der Erkennung der sauren Phospholipidgruppen auf der Bakterien-Oberfläche statt, was im Fall der Histatine durch einen Verlust der Aktivität bei erhöhter Ionenstärke bestätigt werden konnte [122,123]. Das auf bakterieller Ebene prominenteste Ziel der Histatine ist das Bakterium *Streptococcus mutans*, welches die Verantwortung für die Bildung von Karies trägt [124]. Dabei konnte insbesondere für Histatin1 eine Verminderung der Anhaftung von *S. mutans* an die Hydroxylapatit-Oberfläche der Zähne durch Inhibition der Anlagerung humaner Glykoproteine nachgewiesen werden [125].

Auf fungaler Ebene besteht die funktionelle Rolle der Histatine *in vivo* im Wesentlichen aus der Eindämmung des Wachstums von *Candida albicans* in einer oralen Candidiasis [126–128]. *In vitro* zeigten die Histatine allerdings auch anticandidale Aktivität gegen *C. glabrata*, *C. krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* und *Neurospora crassa* [100,129–132]. Dabei konnte unter den drei Haupt-Histatinen die größte Wirkung gegen *C. albicans* für Histatin5 in physiologischen Konzentrationen nachgewiesen werden [100,133–137]. Zudem konnte ein möglicher mehrstufiger molekularer Mechanismus für die antifungale Aktivität ergründet werden, welcher sich auf alle Mitglieder der Histatin-Familie übertragen lässt und als Resultat einer Rezeptor-Bindung die Internalisierung des Peptids und die Interaktion mit intrazellulären Zielen zur Folge hat (Abbildung 1.6, modifiziert nach [138]).



**Abbildung 1.6** Schema des Mechanismus zur antifungalen Aktivität der Histatine, modifiziert nach [138]

Dargestellt ist der vorgeschlagene molekulare Mechanismus der antifungalen Wirkung der Histatine. Die Internalisierung des Peptids führt zu einem ATP-Verlust und DNA-Schäden im Nukleus, was schließlich in einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase resultiert.

Die Internalisierung des Histatin-Peptids ist auf die Erkennung durch und die Bindung an den Hefen-Rezeptor Ssa1/2p zurückzuführen [139–142]. Dabei handelt es sich um Hitzeschock-Proteine, welche sich auf der Zelloberfläche befinden und mit einer Größe von 67-70 kDa durch die Zellwand bis in die Plasmamembran von *C. albicans* reichen [143]. Zudem sind sie als Chaperone an der Proteinfaltung und dem intrazellulären Transport in die Mitochondrien oder andere Zellorganellen beteiligt [144,145]. Die entscheidende Funktion dieses Rezeptors für die Toxizität der Histatine konnte im Fall von Histatin5 durch dessen Deletion nachgewiesen werden, welche eine verminderte Bindung und den Verlust der intrazellulären Translokation zur Folge hatte [146]. Der letztlich ausschlaggebende Schritt für die antifungale Aktivität der Histatine ist aber auf die Ausschüttung des intrazellulären ATP-Gehalts zurückzuführen, welcher unmittelbar nach der Histatin-Zugabe zu strukturell intakten Zellen auftrat [147,148]. Dieser Effekt ist ein Resultat der Histatin-Interaktion mit der Mitochondrienmembran von *C. albicans* und der damit verbundenen Inhibition der oxidativen Phosphorylierung sowie der Bildung von ROS [97,147,149,150]. Außerdem wird der ATP-Austritt durch die Abgabe von Kalium-Ionen begünstigt, welche aufgrund der Interaktion mit dem Kalium-Transporter TRK1p auftritt. Daher gilt dieser als entscheidender Effektor der Toxizität der Histatine [151]. Schließlich werden durch das Eindringen der Histatine DNA-Schäden im Nucleus von *C. albicans* hervorgerufen, welche als Folge den Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase auslösen [152].

In sequentieller und struktureller Hinsicht ist die antifungale Aktivität der Histatine auf einen 14-Aminosäuren-großen Bereich in Histatin3 zurückzuführen. Er umfasst die Aminosäuren 12-25 und ist mit der Sequenz RKFHEKHSHRGYR in den drei Haupt-Histatinen hoch konserviert [100,130,134,136,153,154]. Eine Multiplizierung dieser Domäne durch die Herstellung genetisch modifizierter Konstrukte mit zwei bis vier Sequenz-Wiederholungen konnte die antifungale Aktivität im Vergleich mit dem natürlich vorkommenden Histatin3 um ein Vielfaches steigern [155]. Des Weiteren wurde durch Austausch der dominierenden basischen Aminosäuren in diesem Bereich gezeigt, dass eine Substitution von Lysin 13 durch Glutamin einen nahezu kompletten Verlust der antifungalen Aktivität bewirkte, während das Ersetzen der angrenzenden Histidine 18 und 19 nur minimale Effekte auf die Funktion hatte [130,156]. Da insbesondere für die Fragmente des am stärksten aktiven Histatin5 ein Erhalt der antifungalen Wirkung nachgewiesen wurde, konnte mit dem Derivat P-113 aus dem N-Terminus des Peptids eine weitere minimal aktive Domäne identifiziert werden [156]. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sie *in vitro* und *in vivo* eine starke Aktivität gegen *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* besitzt und dabei auch gegen Fluconazol-resistente Stämme vorgeht [157,158].

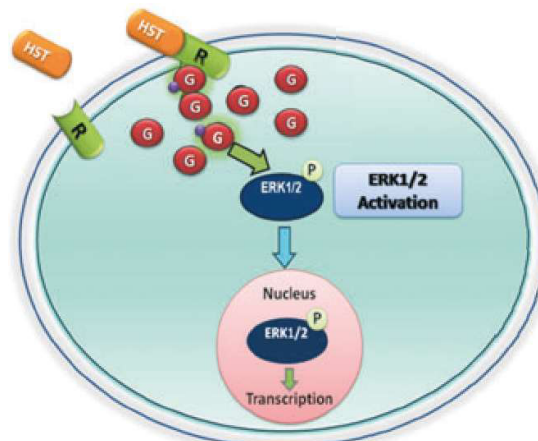
#### 1.3.1.2 Die Wundheilungs-Eigenschaft der Histatine

Wunden in der Mundhöhle heilen deutlich schneller und mit weniger Narbenbildung als Wunden an anderen Stellen des Körpers [159,160]. Dieses Phänomen ist auf die Anwesenheit des Speichels zurückzuführen, welcher zum einen eine Heilungs-fördernde feuchte Umgebung kreiert

und zum anderen Heilungs-unterstützende Peptide bereitstellt. Dabei spielen die Histatine eine wesentliche Rolle in der Heilungs-Induktion und konnten sogar als Hauptwundheilungs-Faktor im menschlichen Speichel identifiziert werden [118,119].

Diese Rolle wurde zunächst den aus dem Speichel isolierten Wachstumsfaktoren wie dem Epidermalwachstumsfaktor (EGF), dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder dem Fibroblastenwachstumsfaktor zugeschrieben [161–163]. So spielt beispielsweise EGF eine entscheidende Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen während der Wundheilung, wie etwa in der Zellproliferation, -differentiation und -migration. Allerdings ist die Konzentration dieser Wachstumsfaktoren im menschlichen Speichel etwa 100.000-mal geringer als im Speichel der untersuchten Nagetiere [164–166]. Daher war es unwahrscheinlich, dass diese Faktoren im Menschen dieselbe markante Rolle wie in Mäusen und Ratten spielen. Durch den Nachweis der Migration von Epithelzellen bei Histatin-Stimulation, konnten dann mit Histatin1, -2 und -3 die verantwortlichen Mediatoren für die Wundheilungs-Aktivität des menschlichen Speichels gefunden werden [118].

Der Vorgang der Wundheilung ist ein mehrstufiger Prozess mit teilweise überlappenden Abschnitten [167]. Nach der initialen Blutung und der eingeleiteten Blutgerinnung folgt die Entzündungsphase. In dieser werden Bakterien und abgestorbene Zelltrümmer entfernt und zur gleichen Zeit durch Faktoren der Entzündungszellen die Zellteilung und -migration von Epithelzellen sowie Fibroblasten stimuliert. In der Proliferationsphase findet eine Vielzahl regenerativer Prozesse, wie Gefäßneubildung, Entstehung einer neuen Kollagenmatrix und Bildung von Granulationsgewebe statt. Anschließend wird die Wunde oberflächlich durch Epithelisation geschlossen. Schließlich werden in der finalen Phase die Kollagenfasern verfestigt und unnötige Zellen mittels Apoptose beseitigt. In diesem komplexen Prozess tragen die Histatine zu einer Verbesserung der Re-Epithelisation bei [119], indem sie die Zellausbreitung und Migration von Epithelzellen und Fibroblasten induzieren (Abbildung 1.7, modifiziert nach [138]).



**Abbildung 1.7 Schema des Mechanismus zur Wundheilungs-Eigenschaft der Histatine, modifiziert nach [138]**

Dargestellt ist der vorgeschlagene molekulare Mechanismus zur Wundheilungs-Aktivität der Histatine. Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors resultiert in einer Steigerung der Zellausbreitung und -migration.

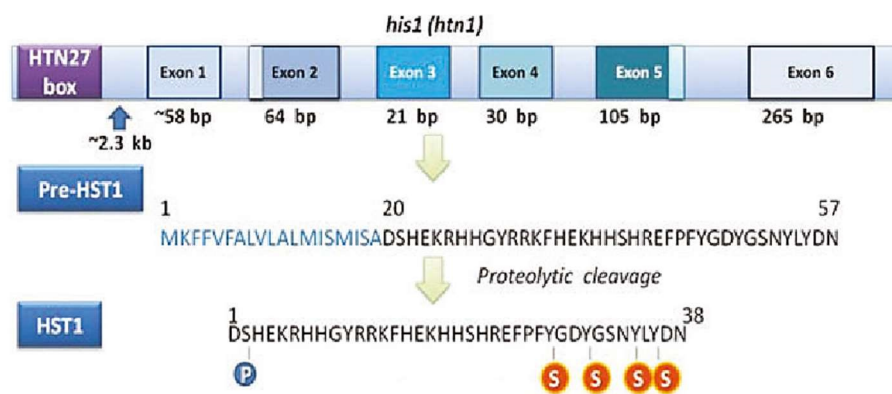
Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt mithilfe eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, welcher wiederum einen intrazellulären Signal-Weg aktiviert. Da die Wundheilungs-Eigenschaft der Histatine unabhängig vom EGF-Rezeptor ist, aber durch das Pertussis-Toxin inhibiert wird, scheinen mithilfe dieses G-Protein gekoppelten Rezeptors ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) stimuliert zu werden [118]. So werden zunächst durch die Rezeptor-Interaktion G-Proteine aktiviert, welche anschließend über eine unbekannte Kinase für die Phosphorylierung der ERK1/2-MAP-Kinase sorgen, was eine gesteigerte Re-Epithelisation zur Folge hat.

Die Aktivierung durch Histatine hat dabei viele Merkmale mit der Aktivierung durch klassische Wachstumsfaktoren gemeinsam. Dies beinhaltet auch die aktive und stereospezifische Aufnahme durch die Zelle, was im Falle von Histatin2 durch ein Fehlen der Wundheilungs-Induktion bei Verwendung des D-Enantiomers nachgewiesen wurde [118]. Die für die Aktivierung notwendige Histatin-Konzentration wird dabei *in vivo* trotz des Peptid-Abbaus durch Proteasen dauerhaft erreicht [168]. Allerdings wurde eine Verbesserung der Wundheilung nur für die Haupt-Histatine Histatin1 und -3 nachgewiesen. Dabei wurde als minimal aktive Wundheilungs-Domäne ein 12-Aminosäuren-großes Fragment von Histatin1 identifiziert, welches mit der Sequenz SHREFPFYGDYDS aus den Aminosäuren 20-32 besteht [119]. Das am wirksamsten antifungal aktive Histatin5 besitzt dagegen keine Wundheilungs-Eigenschaften.

### 1.3.2 Histatin1

Histatin1 ist das einzige Mitglied der Histatin-Familie, welches aufgrund von post-translationalen Modifikationen eine phosphorylierte und mehrere sulfatierte Aminosäuren besitzt.

Die Transkription des Histatin1-codierenden HTN1-Gens wird durch ein positives regulatorisches Element in der Promotor-Region angeregt, welches als HTN27-Box bezeichnet wird [126]. Diese befindet sich 2.3 Kilobasen strangaufwärts vor dem ersten Exon und stimuliert ausschließlich in menschlichen Speicheldrüsen die Transkription von Prä-Histatin1, welches erst durch proteolytische Spaltung zum 28-Aminosäuren-langen Histatin1 wird (Abbildung 1.8, nach [138]).



**Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des Histatin1-codierenden Gens [138]**

Das HTN1-Gen wird durch ein positives regulatorisches Element namens HTN27-Box stimuliert. Nach Spaltung des Prä-Peptids entsteht das 38-Aminosäuren-lange Histatin1, welches post-translational neben der Phosphorylierung (P) an Serin 2 auch Sulfatierungen (S) an Tyrosin 27, 30, 34 und 36 erhält.

Nach proteolytischer Spaltung des Prä-Peptids bietet Histatin1 im Gegensatz zu Histatin3 mit dem Enzym-Erkennungs-Motiv RXXR für eine Membran-gebundene Protease keinen Angriffspunkt für Peptidasen [169]. Stattdessen unterliegt Histatin1 den genannten post-translationalen Modifikationen. So trägt das native Peptid bei Isolation aus dem menschlichen Speichel grundsätzlich eine Phosphorylierung des Serins an Position 2, welcher jedoch bisher keine funktionelle Bedeutung zugeschrieben werden konnte [170]. Zudem konnten verschiedene Histatin1-Derivate mit sulfatierten Tyrosinen identifiziert werden, wobei sowohl mono-Sulfatierungen als auch di-, tri- und tetra-Sulfatierungen auftraten. Diese betreffen allerdings nur die vier C-terminalen Tyrosine und scheinen dem gleichen Modifikations-Muster zu unterliegen wie die Tyrosin-Sulfatierungen des N-Terminus von CCR5 [171]. Ein funktioneller Beitrag der Tyrosin-Sulfatierungen in Histatin1 wurde allerdings ebenfalls noch nicht festgestellt.

Histatin1 ist ein multifunktionales Peptid, welches eine wesentliche Rolle in der Regulation der Dynamik gelöster Calciumphosphat-Mineralen im Speichel spielt. So besitzt es die Fähigkeit durch seine Bindung an Hydroxylapatit ein Kristallwachstum in übersättigten Lösungen zu inhibieren und dadurch das Ausfallen von Calcium-Salzen, beispielsweise in Form von Zahnstein-Bildung, zu verhindern [153,172–174]. Außerdem leistet Histatin1 durch seine Bindung an die Zahnoberfläche einen wichtigen Beitrag im Aufbau der Pellikel-Schicht, welche den Zahnschmelz gegen äußere Einflüsse aus dem Mundraum abschirmt [175–177]. Eine weitere wichtige Fähigkeit von Histatin1 betrifft die Abwehr von Infektionen Gram-negativer Bakterien. So konnte im Fall von *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota* und *Pseudomonas aeruginosa* eine Bindung an die entsprechenden Lipopolysaccharide nachgewiesen werden, welche eine Zerstörung der Wirts-Erythrozyten verhindert [115]. Zusätzlich besitzt Histatin1 natürlich auch wie alle anderen Histatine eine antimikrobielle Aktivität sowie Wundheilungs-Eigenschaften. Diese sind auf spezifische Bereiche des Peptids zurückzuführen (Abbildung 1.9, nach [138]).



**Abbildung 1.9 Die Sequenz von Histatin1 mit ihren funktionellen Bereichen, modifiziert nach [138]**

Das dargestellte Histatin1 besitzt eine N-terminale Domäne mit antimikrobieller Aktivität und eine C-terminale Domäne mit Wundheilungs-Eigenschaften. In rot und blau sind die möglichen Metall-Bindungsstellen für Cu(II)/ Ni(II) bzw. Zn(II) hervorgehoben.

Struktur-Funktions-Studien konnten die antimikrobielle Aktivität einer N-terminalen Domäne (AS 1-24) und die Wundheilungs-Eigenschaften einer C-terminalen Domäne (AS 20-32) zuordnen [108,178,179]. Allerdings liegt die Wirksamkeit der antimikrobiellen Aktivität von Histatin1 im Vergleich der drei Haupt-Histatine weit hinter der Effektivität von Histatin5 [136]. Dagegen zeigt Histatin1 herausragende Wundheilungs-Eigenschaften, welche sogar durch eine



N- zu C-terminale Zyklisierung des Peptids um das 1000-fache gesteigert werden konnten [119]. Dabei konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Rezeptor-Interaktion eine spezielle Konformation des Peptids voraussetzt.

## 1.4 Zielsetzung

---

Oftmals sind es Anomalien in der natürlichen Expression eines Proteins, die auf seine besondere Funktion und sein Potential aufmerksam machen. Dabei ist es irrelevant, ob der veränderte Zustand auf eine verringerte oder eine erhöhte Expression zurückzuführen ist. So bedingte im ersten Fall eine durch das Fehlen des Corezeptors hervorgerufene HIV-Resistenz den Einsatz von CCR5-Antagonisten bei der Virus-Bekämpfung. Im anderen Fall dagegen führte die Entdeckung eines erhöhten Histatin-Spiegels in immunschwachen Patienten zu alternativen Behandlungs-Ansätzen bei akuten *Candida*-Infektionen.

Bezugnehmend auf den ersten Fall, handelt es sich bei der Expressions-Anomalie des CCR5-Rezeptors um die sogenannte CCR5 $\Delta$ 32-Mutation, welche aus einer Deletion von 32 Basenpaaren im CCR5-Gen besteht [90,180,181]. Sie bewirkt eine Leseraster-Verschiebung der auf Position 174 folgenden Aminosäuren, wodurch ein Stopp-Codon an Position 184 eingefügt wird. Damit verliert das Protein seine hinteren drei Transmembran-Domänen sowie Regionen, die für die Interaktion mit G-Proteinen und die Signal-Transduktion erforderlich sind. Zudem wird die Expression des CCR5-Rezeptors auf der Zelloberfläche inhibiert. Dementsprechend sind homozygote  $\Delta$ 32-Individuen vor einer HIV-Infektion durch R5-trope Stämme geschützt. Diese Entdeckung förderte die Idee, gegen die initiale HIV-Infektion mit einem CCR5-Antagonisten vorzugehen, der die Bindung von gp120 negativ beeinflusst. So wurden beispielsweise die Medikamente *Maraviroc* (Pfizer), *Vicriviroc* (ScheringPlough) und *Aplaviroc* (GlaxoSmithKline) entwickelt, welche durch Bindung an die hydrophoben Aminosäuren in den Transmembran-Domänen des CCR5-Rezeptors die Interaktion mit dem Virus und damit einen Zelleintritt verhindern können [182–184]. Dabei ist anzumerken, dass der Inhibitions-Mechanismus auf der Unterbindung einer Konformations-Änderung des CCR5-Rezeptors basiert und daher erst relativ spät während des viralen Absorptionsprozesses einsetzt. Daher wäre ein Inhibitor, der direkt zu Beginn die für eine gp120-Bindung erforderlichen Wechselwirkungen mit dem N-Terminus durch Maskierung der sulfatierten Tyrosine vereitelt, sicherlich zu bevorzugen.

In Bezug auf den zweiten Fall lässt sich an dieser Stelle interessanterweise eine Verbindung zwischen HIV-Infektionen und Histatinen herstellen. So konnte in HIV-positiven Patienten ein signifikant erhöhter Histatin-Spiegel nachgewiesen werden [185,186]. Gleichzeitig weisen etwa 46 % aller an AIDS Erkrankten Symptome einer oralen Candidiasis auf [187]. In Verbindung mit der zunehmenden Ausbildung fungaler Resistenzen gegen die bestehenden Azol-basierten Medikamente wie *Fluconazol* und *Amphotericin B*, liegt daher die Idee nahe, bei der Behandlung

von *Candida*-Infektionen einen natürlichen Inhibitor einzusetzen. Dieser hat den Vorteil, trotz seiner überzeugenden antifungalen Aktivität gegen *C. albicans* keine negativen Auswirkungen in Zellen oder Gewebe zu induzieren. Im Besitz dieser Eigenschaften, sind die Histatine dementsprechend ideale Ausgangsstoffe um entsprechende Medikamente zu entwickeln. Zudem können sie aufgrund fehlender Toxizität präventiv in Oberflächen-Gelen, Zahnersatz oder künstlichem Speichel zur Bekämpfung von Mundtrockenheit angereichert werden [130]. In diesem Zusammenhang wurde bereits die Wirksamkeit eines Histatin5-Fragments in klinischen Studien nachgewiesen, wobei dieses trotz seiner geringen Größe die vollständige antifungale Aktivität erhalten konnte [158]. Da jedoch Fragmente aus Histatin5 bekanntermaßen keine Wundheilungs-Fähigkeiten besitzen, wäre ein Peptid, welches beide funktionellen Eigenschaften vereint, diesen gegenüber im Vorteil. Zudem könnte durch das Einbringen sulfatierter Tyrosine möglicherweise eine höhere Spezifität erreicht werden.

Folglich ist das Ziel dieser Arbeit zweigeteilt. Ausgehend von einer gemeinsamen post-translationalen Modifikation soll in der einen Richtung die Tyrosin-Sulfatierung eines transmembranen Proteins als *Target* für einen zu ermittelnden Binder verwendet und in der anderen Richtung die Tyrosin-Sulfatierung eines sekretierten Proteins im Zuge seiner Charakterisierung auf ihre funktionelle Bedeutung untersucht werden.

Im Detail heißt das, als erste Aufgabe sollen für eine Sequenz aus dem N-Terminus des CCR5-Rezeptors Binder mithilfe einer kombinatorischen Protein-Bibliothek identifiziert werden. Dazu wird zunächst eine Bibliothek auf Basis eines Protein-Gerüsts entwickelt und das gewählte Ziel-Peptid mittels Festphasen-Peptid-Synthese hergestellt. Für die Selektion bindender Mutanten soll ein Ribosomen-Display laborintern etabliert werden. Nach Identifikation der ausgewählten Mutanten werden diese zunächst durch zielgerichtete Mutagenese in einen Expressionsvektor eingebracht. Die Expression und Reinigung erfolgt in Anlehnung an das *Wildtyp*-Protein. Anschließend wird die Bindungs-Affinität der identifizierten Mutanten gegenüber der sulfatierten und nicht-sulfatierten Variante des Ziel-Peptids mithilfe eines Fluoreszenz-Anisotropie-Assays untersucht. Dabei wäre es wünschenswert einen Binder auszumachen, der die Fähigkeit besitzt zwischen einem sulfatierten und einem nicht modifizierten Tyrosin zu diskriminieren.

Als zweite Aufgabe soll das im Gegensatz zu Histatin5 kaum untersuchte Histatin1 strukturell und funktionell charakterisiert werden. Dazu wird dieses zunächst in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und die optional isotoopenmarkierte Expression in *E. coli* sowie die zugehörige Reinigung etabliert. Anschließend wird die dreidimensionale Struktur des Peptids in hydrophiler Umgebung mithilfe von verschiedenen homonuklearen 2D-Spektren aufgelöst. Außerdem sollen sowohl die antifungale Aktivität als auch die Wundheilungs-Eigenschaften von Histatin1 unter Beachtung der funktionellen Domänen untersucht werden. So wird ein N-terminales Fragment im Vergleich mit synthetischem und rekombinantem Peptid in einem



Toxizitäts-Assay gegen *S. cerevisiae* eingesetzt. Des Weiteren soll ein Wundheilungs-Assay laborintern etabliert werden, mit welchem ein C-terminales Fragment als sulfatierte und nicht sulfatierte Variante mit dem rekombinanten und synthetischen Peptid verglichen werden kann. Dabei wäre es letztendlich wünschenswert, die funktionellen Eigenschaften von Histatin1 auf strukturelle Elemente zurückführen zu können und so einen Hinweis auf die Bedeutung der Tyrosin-Sulfatierung zu erlangen.

## 2 MATERIALIEN & METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien können Tabelle 2.1 entnommen werden. Die Bausteine für die Festphasen-Peptid-Synthese sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
AA/Bis Rotiphorese Gel 30	Roth
Acetonitril	Caldic
Agar	Roth
Agarose	Roth
$^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ )	Cambridge Isotopes
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Borsäure	Roth
Bovines Serum-Albumin (BSA)	NEB
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Cobalt(II)chlorid Hexahydrat	Fluka
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
Cyanocobalamin (Vitamin B <sub>12</sub> )	Sigma-Aldrich
Deuteriumoxid (D <sub>2</sub> O) 99,9 %	Deutero GmbH
Desoxyribonukleotid-Triphosphat	Metabion
Diethylether	Normapur
Diisopropylethylamin (DIEA)	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
Dimethylformamid (DMF)	Normapur
2,2-Dimethyl-2-silaptan-5-sulfonat (DSS)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	DMSO
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dobacco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN-Biotech
Eisen(III)citrat	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Caldic
Ethanol	Caldic
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	Roth

<b>Fetal calf serum (FCS)</b>	PAN-Biotech
<b>Hefeextrakt</b>	Roth
<b>Hoechst 33258</b>	Life Technologies
<b>Isopropanol</b>	Caldic
<b>Isopropyl-<math>\beta</math>-thiogalactopyranosid (IPTG)</b>	AppliChem
<b>D-Glucose</b>	Roth
<b>Glutathion reduziert</b>	Roth
<b>Glycerin 86 %</b>	Roth
<b>HTTU</b>	Acros
<b>Imidazol</b>	Fluka
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Roth
<b>Kaliumchlorid</b>	Roth
<b>Kanamycinsulfat</b>	Roth
<b>Lysozym</b>	Fluka
<b>Magnesiumchlorid</b>	Roth
<b>Magnesiumdiacetat</b>	Roth
<b>Magnesiumsulfat</b>	Fluka
<b>Malzextrakt</b>	Roth
<b>Manganchlorid</b>	Fluka
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Serva
<b>Midori Green</b>	Nippon Genetics
<b>Minimum Essential Medium Eagle (MEM)</b>	PAN-Biotech
<b>Natriumdihydrogenphosphat Heptahydrat</b>	Roth
<b>Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat</b>	Roth
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Roth
<b>Natriumchlorid</b>	Roth
<b>Natriumhydroxid</b>	Roth
<b>Natriummolybdat</b>	Roth
<b>Natriumselenit</b>	Fluka
<b>Nickelchlorid</b>	Roth
<b>N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Orange G</b>	Roth
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma-Aldrich
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	Life Technologies
<b>Pepton</b>	Fluka
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</b>	Roth
<b>Piperidin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Ribonuclease A</b>	AppliChem
<b>Rubidiumchlorid</b>	Roth
<b>Salzsäure</b>	AppliChem
<b>Tetramethylethylendiamin (TEMED)</b>	Roth

<b>Thiaminchlorid-hydrochlorid (Vitamin B<sub>1</sub>)</b>	Merck
<b>Trifluoroessigsäure (TFA)</b>	Sigma-Aldrich
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)</b>	Roth
<b>Tricin</b>	AppliChem
<b>Triton X-100</b>	Sigma-Aldrich
<b>Trypton</b>	Roth
<b>L-Tryptophan</b>	AppliChem
<b>Trypsin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Tween20</b>	Roth
<b>Zinkchlorid</b>	Fluka

Tabelle 2.2 Peptid-Synthese-Bausteine

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Fmoc-Ala-Wang-Resin (100-200 mesh)</b>	Merck
<b>Fmoc-Asn(Trt)-OH</b>	Merck
<b>Fmoc-Ile-OH</b>	Merck
<b>Fmoc-Ser(tBu)-OH</b>	Merck
<b>Fmoc-Thr(tBu)-OH</b>	Merck
<b>Fmoc-Tyr-OH</b>	Merck
<b>Fmoc-Tyr-(SO<sub>3</sub> NnBu<sub>4</sub>)</b>	Merck
<b>N-Methylanthranylsäure (MANT)</b>	Sigma-Aldrich

### 2.1.2 Peptide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Peptide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3 Eingesetzte Peptide

<b>Sequenz</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>IN<sub>5</sub>YYTSA-(Wang-Resin)</b>	sY-Säule	*
<b>MANT- IN<sub>5</sub>YYTSA-OH</b>	sY-Peptid	*
<b>INYYTSA-(Wang-Resin)</b>	Y-Säule	*
<b>MANT- INYYTSA-OH</b>	Y-Peptid	*
<b>DSHEKRHHGYRRKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN</b>	rek.Hist1	Caslo
<b>EKRHHGYRRKFH</b>	N-Term.Hist1	Caslo
<b>SHREFPFYGDYGS</b>	C-Term.Hist1	Caslo
<b>SHREFPF<sub>s</sub>YGDYGS</b>	sulf.C-Term.Hist1	Caslo

\*selbstständige Herstellung durch SPPS (Kapitel 2.6.2)

### 2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

Im Zuge der Klonierung (Kapitel 2.2.4) der IRS1-PTB-Domäne und Mutante-1 bis -3 sowie von Histatin1 wurden die Vektoren pEX-A2, pET41a(+), pET41b\_*PreScission*, pET-SUMOadapt und

pCR2.1-*TOPO* als Ausgangs-Plasmide verwendet (Anhang A). Von den daraus generierten Konstrukten wurde IRS1-PTB-GenIII(211-299) in pET41a(+) von der Firma *Sina Science Services* kloniert und pEX-A2 von der Firma *Eurofins* als Transportvektor für Histatin1 eingesetzt. Tabelle 2.4 zeigt alle verwendeten Konstrukte in der Übersicht.

Tabelle 2.4 Verwendete Konstrukte

Insert und Vektor	Interne BC-Nummer
IRS1-PTB-GenIII(211-299) in pET41a(+)	934
IRS1-PTB in pET41b_ <i>PreScission</i>	1108
Mutante-1 in pET41b_ <i>PreScission</i>	1109
Mutante-2 in pET41b_ <i>PreScission</i>	1110
Mutante-3 in pET41b_ <i>PreScission</i>	1111
Histatin1 in pEX-A2	1121
Histatin1 in pET-SUMOadapt	1122

Die in Tabelle 2.5 dargestellten verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Metabion* synthetisiert.

Tabelle 2.5 Verwendete Oligonukleotide

Sequenz (5'→3')	Interne Nummer
tctctcctcgagggctcaccttcacgggtgggccctgtagcgcgttttcatcggcattttc	894R
gcgaaattaatacgaactcactataggg	895F
cccgggccccgtcacggcMNNMNNMNNcacctcgatgaagaagaagttttccga gtggccacagcgMNNgatgttMNNcagctgcagcaccacgg	896R
cacgagaccatcctggaggccNNKNNKgcatgNNKgatgagttccgccctcgcg	897F
cacacaggatccggacccgcattcaaagag	1015F
tctctcctcgagattagcgagggcggaactc	1016R
gtaaaacgacggccag	2060F
caggaaacagctatgac	2061R
ggccactcggaactcctcttcacgaggtgggc	2078F
ggccacctcgatgaagaggaagttttccggtggcc	2079R
ggccactcggaactcccttcaccgaggtgggcccgt	2080F
acggcccacctcgggtgaacacccactttccgagtgccc	2081R
cacacaggtctcatggtgattcgca	2116F
ggttggggatccattagttatcatcacaggt	2117R

#### 2.1.4 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika lagen in wässrigen *Stock*-Lösungen vor und wurden in einer Konzentration von 1:1000 eingesetzt. Dabei betrug die Konzentration des Ampicillin-*Stocks* 100 mg/ml und die des Kanamycin-*Stocks* 50 mg/ml. Beide *Stock*-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert und nach dem Anbrechen bei 4 °C aufbewahrt.

## 2.1.5 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

**Tabelle 2.6 Verwendete Enzyme**

Funktion	Bezeichnung	Hersteller
Polymerase	dreamTaq	Fermentas
Polymerase	mi-Pfu	Metabion
Polymerase	Pfu-X	Fermentas
Inhibitor	RNAse Inhibitor	NEB
Restriktionsenzym	BamHI (fast digest)	Fermentas
Restriktionsenzym	XhoI (fast digest)	Fermentas
Restriktionsenzym	BsaI	NEB
Restriktionsenzym	BamHI	NEB
Ligase	T4 DNA Ligase	Metabion
Protease	<i>PreScission</i> -Protease	*
Protease	<i>SUMO</i> -Protease	*

\*laborinterne Expression und Reinigung durch Alma Rute

## 2.1.6 Zelllinien

### 2.1.6.1 Bakterienstämme

Für die Vermehrung der Plasmid-DNA wurden *E. coli ElectroShox* der Firma *Bioline* verwendet. Als Expressionsstämme wurde *E. coli* BL21 und *E. coli* C43 eingesetzt.

**Tabelle 2.7 Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli ElectroShox</i>	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 ara $\Delta$ 139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK - rpsL (Str <sup>R</sup> ) nupG <sup>-</sup>	Bioline
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-T1 <sup>R</sup>	F- ompT hsdS <sub>B</sub> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) gal dcm $\lambda$ (DE3) tonA	Sigma-Aldrich
<i>E. coli</i> CR43 DE3	F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)	*

\*zur Verfügung gestellt von AG Ehrmann

### 2.1.6.2 Hefen

Für den Toxizitäts-Assay (Kapitel 2.3.3) wurde *S. cerevisiae* ATCC<sup>®</sup> 9763<sup>™</sup> eingesetzt.

### 2.1.6.3 Humane Zelllinie

Der Wundheilungs-Assay (Kapitel 2.3.4) wurde mit der bukkalen Epithelzelllinie TR146 durchgeführt.

## 2.1.7 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8 Verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>LB-Medium (pH 7.0)</b>	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
<b>M9-Phosphatmedium</b>	3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g NaCl, 1g <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl, 6,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O ad 1 L ddH <sub>2</sub> O  2 mL MgSO <sub>4</sub> (1 M), 2 mL TS2×50, 1mL Fe(III)citrat (10 mM), 8 g Glucose, 100 µL CaCl <sub>2</sub> (1 mM), 100 µL VitB <sub>1</sub> (0,5 %)
<b>SOC-Medium</b>	0,2 g Trypton, 0,05 g Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose ad 100 mL ddH <sub>2</sub> O
<b>DMSZ-Medium (pH 6.8)</b>	15 g Agar, 10 g Glucose, 5 g Pepton, 3 g Hefeextrakt, 3 g Malzextrakt ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
<b>TR146-Medium</b>	50 mL FCS, 5 mL MEM, 5 mL Penicillin-Streptomycin ad 500 mL DMEM

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.9 zusammengetragen.

Tabelle 2.9 Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>	
<b>TAE-Puffer (pH 8.5)</b>	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
<b>Kultivierung und Expression</b>	
<b>50×TS2</b>	2,4 mM ZnSO <sub>4</sub> , 0,15 mM MnCl <sub>2</sub> , 4,9 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0,84 mM CoCl <sub>2</sub> , 0,8 mM NiCl <sub>2</sub> , 5,8 mM CuCl <sub>2</sub> , 4,3 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 0,12 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>
<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	1,25 g Coomassie BB 250-G, 227 mL Ethanol, 46 mL Essigsäure, 227 mL ddH <sub>2</sub> O
<b>Entfärbelösung</b>	50 mL Essigsäure, 75 mL Ethanol, 875 mL ddH <sub>2</sub> O

**SDS-PAGE**

<b>Laemmli-Sammelgel-Puffer (pH 6.8)</b>	125 mM Tris/HCl, 1 % APS
<b>Laemmli-Trenngel-Puffer (pH 8.8)</b>	750 mM Tris/HCl
<b>Laemmli-Puffer (pH 8.3)</b>	25 mM Tris, 1 % SDS, 2,5 mM Glycerin
<b>2x Laemmli-Probenpuffer (pH 6.7)</b>	125 mM Tris/HCl, 50 % Glycerin, 10 % SDS, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0,01 % Bromphenolblau

**Tris/Tricin-PAGE**

<b>Gel-Puffer (pH 8.45)</b>	3 M Tris/HCl, 0,3 % SDS
<b>Anoden-Puffer (pH 8.9)</b>	0,2 M Tris/HCl
<b>Kathoden-Puffer</b>	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS
<b>4x Proben-Puffer (pH 6.8)</b>	4 mL Tris/HCl (0,5 M), 4,8 mL Glycerin (86 %), 1,6 g SDS, 4 mg Coomassie BB 250-G, 1,2 mL ddH <sub>2</sub> O

**Protein-Reinigung****Affinitäts-Chromatographie**

<b>GST-Basispuffer (pH 7.5)</b>	50 mM Tris, 50 mM NaCl
<b>GST-Hochsalzpuffer (pH 7.8)</b>	50 mM Tris, 500 mM NaCl
<b>GST-Elutionspuffer (pH 7.8)</b>	50 mM Tris, 50 mM NaCl, 20 mM Glutathion reduziert

**His-tag-IMAC**

<b>His-Basispuffer (pH 8.0)</b>	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl
<b>His-Hochsalzpuffer (pH 8.0)</b>	50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl

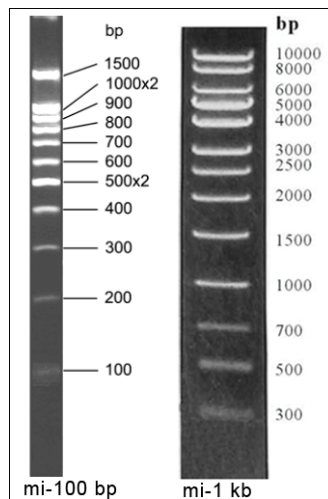


<b>His-Elutionspuffer (pH 8.0)</b>	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol
<b>Protease-Puffer (pH 7.5)</b>	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl
<b>Gelfiltration</b>	
<b>Gelfiltrations-Puffer (pH 7.0)</b>	20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM KCl
<b>Zellkultur</b>	
<b>PBS-Puffer</b>	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ad 1 L $\text{H}_2\text{O}$
<b>Ribosomen-Display</b>	
<b>Stopp-Puffer (pH 7.5)</b>	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 0,1 % Tween
<b>Wasch-Puffer (pH 7.5)</b>	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 50 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$
<b>Hochsalzpuffer<sub>300</sub> (pH 7.5)</b>	50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$
<b>Hochsalzpuffer<sub>500</sub> (pH 7.5)</b>	50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$
<b>Elutionspuffer<sub>2</sub> (pH 7.5)</b>	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 2 mM EDTA
<b>Elutionspuffer<sub>20</sub> (pH 7.5)</b>	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 20 mM EDTA
<b>NMR-Spektroskopie</b>	
<b>NMR-Puffer (pH 6.5)</b>	20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$

## 2.1.9 Marker

### 2.1.9.1 DNA-Marker

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden als DNA-Größenstandards die 100 bp und 1 kb *Quickload*-Marker von NEB verwendet (Abbildung 2.1).

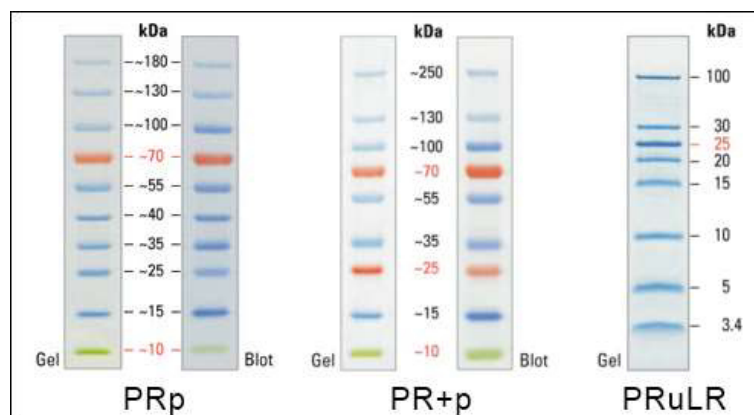


**Abbildung 2.1 Verwendete DNA-Marker**

Der mi-100 bp reicht von 100 bis 1500 bp, während der mi-1 kb den Bereich von 300 bis 10000 bp abdeckt.

### 2.1.9.2 Protein-Marker

Für die SDS- und Tris/Tricin-PAGE wurden als Protein-Größenstandards der *Page Ruler™ prestained* (PRp), der *Page Ruler™ Plus prestained* (PR+p) und der *Page Ruler™ unstained low range* (PRuLR) der Firma Thermo Scientific verwendet (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2 Verwendete Protein-Marker**

Der *Page Ruler™ prestained* (PRp) deckt einen Bereich von 10-180 kDa ab, der *Page Ruler™ Plus prestained* (PR+p) beinhaltet Protein-Größen von 10-250 kDa und der *Page Ruler™ unstained low range* (PRuLR) von 3,4 bis 100 kDa.

### 2.1.10 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2.10 aufgelistet.

**Tabelle 2.10 Verwendete Kits**

Funktion	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Präparation	NucleoSpin® Plasmid	Macherey Nagel
Gel-Extraktion	NucleoSpin® Gel & PCR clean up	Macherey Nagel

<b>Zielgerichtete Mutagenese</b>	QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis	Agilent Technologies
<b>TOPO-Klonierung</b>	TOPO®-TA cloning	Life Technologies
<b>mRNA-Extraktion</b>	NucleoTrap® mRNA	Macherey Nagel
<b>in vitro Expression</b>	PURExpress® in vitro protein synthesis	NEB
<b>Reverse Transkription</b>	Superscript™ II Reverse Transcriptase	Life Technologies
<b>Wundheilung</b>	Oris™ Cell Migration Assay	Platypus Technologies

### 2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.11 aufgelistet.

**Tabelle 2.11 Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Funktion</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Einmalküvetten</b>		Roth
<b>GST-Säule</b>	GSTrap FF 16/10, 20 mL	GE Healthcare
<b>Handschuhe</b>		VWR
<b>Konzentrator</b>	Vivaspin 2000 MWCO, 15R	Sartorius
<b>Konzentrator</b>	Vivaspin 10000 MWCO, 20R	Sartorius
<b>NMR-Röhrchen</b>	APS-800-7 NMR tubes	Schott Economics
<b>Papiertücher</b>		Kimberley-Clark
<b>Petrischalen</b>	100 × 20 mm	Greiner Bio One
<b>Pipettenspitzen</b>		Sarstedt
<b>Reaktionsgefäße</b>	0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 5 mL	Eppendorf
<b>Reaktionsgefäße</b>	15 mL, 50 mL	Sarstedt
<b>Spritzenfilter</b>	Rotilabo®-Spritzenfilter 0,45 µm	Roth
<b>Sterilfilter</b>	Express™ PLUS 0,22 µm	Millipore
<b>96-Wellplatte</b>	234 µL	Greiner Bio One
<b>Zellkulturflaschen</b>	5 mL, 10 mL	Greiner Bio One

### 2.1.12 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.12 aufgelistet.

**Tabelle 2.12 Verwendete Geräte**

<b>Funktion</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarose-Gel Analysierer</b>	BioDoc Analyze	Biometra
<b>Autoklav</b>	H+P Varioklav® 25 T	H+P Labortechnik
<b>Batch-Reaktor</b>	200 ml	Universität DUE
<b>Elektrophorese-Kammer</b>	XCell Mini Subcell GT	BioRad
<b>Elektrophorese-Kammer</b>	XCell Mini Protean 3	BioRad
<b>Elektroporationsgerät</b>	MicroPulser™	BioRad
<b>Feinwaage</b>	ABJ 80-4M	Kern
<b>Fluoreszenz-Spektrometer</b>	Cary Eclipse	Agilent Technologies

<b>FPLC</b>	Äkta FPLC P920	GE Healthcare
<b>FPLC</b>	BioLogic Duo Flow	BioRad
<b>Gelfiltrations-Säule</b>	HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare
<b>Gelfiltrations-Säule</b>	10/300 GL Superdex Peptide 30 pg	GE Healthcare
<b>GST-Säule</b>	GSTrap FF 16/10, 20 ml	GE Healthcare
<b>HPLC</b>	Shimadzu HPLC-System	Shimadzu
<b>Inkubator</b>	Thermomixer comfort	Eppendorf
<b>Inkubator</b>	Mikrobiologischer Inkubator BD53	Binder
<b>Inkubator</b>	Minitron	Infors HT
<b>Küvette</b>	Elektroporations-Küvette 0,2 cm	BioRad
<b>Küvette</b>	Fluoreszenz-Küvette 108F-QS	Hellma Analytics
<b>Laborwaage</b>	EG 620-3N	Kern
<b>Magnetrührer</b>	Assistant RM5	Heidolph Instruments
<b>Massenspektrometer</b>	LC-MS LCQ Fleet™ ESI	Thermo Scientific
<b>Ni-NTA-Säule</b>	Protino NiNTA Agarose	Macherey Nagel
<b>NMR-Spektrometer</b>	Ultrashield 700 MHz	Bruker BioSpin
<b>PCR-Gerät</b>	Mastercycler epgradient	Eppendorf
<b>PCR-Gerät</b>	T 3000 Thermocycler	Biometra
<b>pH-Meter</b>	SevenEasy	Mettler Toledo
<b>Photometer</b>	Nanodrop UV/Vis ND-1000	Peqlab
<b>Pipetten</b>	Einkanal-Pipetten	Eppendorf
<b>Pumpe</b>	Hochvakuumpumpe RZ 2,5	Vacuubrand GmbH
<b>Rotor</b>	Ti45	Beckmann
<b>Rotor</b>	JL-25.5	Beckmann
<b>Schüttler</b>	Duomax 1030	Heidolph Instruments
<b>Sterilbank</b>	Hera safe	Thermo Scientific
<b>Stromversorgung</b>	PowerPac basic	BioRad
<b>Ultraschallsonde</b>	Sonoplus HD2200	Bandelin
<b>Vortexer</b>	Vortex Genie 2	Scientific Industries
<b>Wasseraufbereiter</b>	Milli-Q Biocel	Millipore
<b>Zentrifuge</b>	Tischzentrifuge Minispin Plus	Eppendorf
<b>Zentrifuge</b>	Tisch-Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
<b>Zentrifuge</b>	Avanti JE	Beckmann
<b>Zentrifuge</b>	Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckmann

### 2.1.13 Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software kann Tabelle 2.13 entnommen werden.

**Tabelle 2.13 Verwendete Software**

Software	Funktion	Referenz
<b>CCpNmr Analysis 2.3</b>	Visualisierung, Bearbeitung und Auswertung von NMR-Spektren	[188]

<b>Cyana 2.1</b>	Struktur-Berechnung	[189]
<b>GraphPad Prism 5.04</b>	Statistische Daten-Auswertung	[190]
<b>Protparam</b>	Kalkulation von Protein-Eigenschaften	[191]
<b>PyMOL 1.4</b>	Visualisierung von Protein-Strukturen	[192]
<b>SnapGene Viewer 2.2.2</b>	Elektronische Klonierung und Sequenz-Alignments	GSL Biotech LLC
<b>Topspin 3.0</b>	Aufnahme und Prozessierung von NMR-Spektren	Bruker BioSpin

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei sich die negative Ladung der DNA zunutze gemacht wird. Dabei kann die Geschwindigkeit, mit der die Fragmente bei Anlegen konstanter Spannung von der Kathode zur Anode wandern, durch die Agarose-Konzentration im Gel beeinflusst werden.

So wurden abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente 1-2 %ige [w/v] Gele verwendet, wobei die entsprechende Masse an Agarose in TAE-Puffer bis zum vollständigen Lösen aufgekocht wurde. Dem noch flüssigen Agarose-Gel wurde *Midori Green* zugesetzt um eine Visualisierung der DNA unter UV-Licht zu ermöglichen. Die DNA-Proben wurden mit dem Farbstoff *Orange G* versetzt und zusammen mit den Größenmarkern mi-100 bp und mi-1 kb aufgetragen (Kapitel 2.1.2). Anschließend wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 111 V durchgeführt.

### 2.2.2 DNA-Isolation und Reinigung

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (Kapitel 2.2.1) sowie aus PCR- und Restriktions-Ansätzen (Kapitel 2.2.3, 2.2.4) wurde das Kit *Nucleo Spin® Gel & PCR clean up* der Firma *Macherey-Nagel* nach Hersteller-Angaben verwendet.

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurde eine *E. coli*-Kultur angezogen und durch Zentrifugation geerntet (4000 × g, 2 min, 4 °C). Die Isolation und Reinigung des in der Bakterien-Kultur enthaltenen Plasmids erfolgte mithilfe des Kits *Nucleo Spin® Plasmid* der Firma *Macherey Nagel* nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.3 DNA-Amplifikation (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Verfahren zur Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts, welcher durch die Auswahl spezifischer *Primer* gezielt amplifiziert werden kann. Dabei wird die eingesetzte *Template*-DNA zunächst bei 94-95 °C denaturiert und durch anschließendes Abkühlen eine Hybridisierung mit den *Primern* ermöglicht (*Annealing*). In der abschließenden Elongations-Phase kann nun der *antisense*-Strang durch die DNA-Polymerase synthetisiert

werden. Zur exponentiellen Vermehrung der DNA wird der gesamte Zyklus zwischen 25- und 40-mal wiederholt.

### 2.2.3.1 Amplifikation der Bibliothek

Zur Erzeugung der IRS1-PTB-GenIII-Konstrukte für das Ribosomen-Display, wurde der von der Firma *Sina Science Services* klonierte pET41a(+)-Vektor (BC 934) insgesamt 2-mal amplifiziert. Dabei wurden zunächst zwei PCR-Fragmente mit einer Größe von 362 bp (PCR I) bzw. 333 bp (PCR II) generiert.

**Tabelle 2.14 PCR-Bestandteile für PCR I**

Bestandteil	Menge
Template [BC 934]	1 µL
Primer [895F / 896R]	1µL / 1 µL
dNTP Mix (10 mM)	4 µL
DMSO	1 µL
DreamTaq-Puffer (10×)	5 µL
DreamTaq-Polymerase	0,8 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

**Tabelle 2.15 PCR-Bestandteile für PCR II**

Bestandteil	Menge
Template [BC 934]	1 µL
Primer [897F / 894R]	1µL / 1 µL
dNTP Mix (10 mM)	4 µL
DMSO	1 µL
DreamTaq-Puffer (10×)	5 µL
DreamTaq-Polymerase	0,8 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

**Tabelle 2.16 PCR-Programm für PCR I und PCR II**

Temperatur [° C]	Zeit [min]	Zyklen-Anzahl
94	2:00	1
94	0:30	5
51	0:45	
72	1:00	
94	0:30	30
55	0:45	
72	1:00	
72	8:00	1
8	-	

Die aus PCR I und PCR II hervorgehenden PCR-Produkte wurden in einer sogenannten Fusions-PCR als Primer eingesetzt und auf diese Weise zu einem 739 bp-großen Fragment verknüpft.

**Tabelle 2.17 PCR-Bestandteile für die Fusions-PCR**

Bestandteil	Menge
Template [BC 934]	0,5 µL
Primer [PCR I / PCR II]	2 µL / 2 µL
dNTP Mix (10 mM)	4 µL
DMSO	1 µL
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	1 µL
DreamTaq-Puffer (10×)	5 µL
DreamTaq-Polymerase	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

**Tabelle 2.18 PCR-Programm für die Fusions-PCR**

Temperatur [° C]	Zeit [min]	Zyklen-Anzahl
94	5:00	1
94	1:00	5
58	1:00	
72	1:30	
94	0:30	5
62	1:00	
72	1:30	
94	0:30	25
72	1:00	
72	1:30	
72	6:00	1
8	-	

### 2.2.3.2 Amplifikation der cDNA aus dem Ribosomen-Display

Die mithilfe der Reversen Transkription aus dem Ribosomen-Display gewonnene cDNA (Kapitel 2.4.5) sollte vor ihrer *TOPO*-Klonierung zunächst vervielfältigt werden. Das amplifizierte Fragment besaß eine Größe von 739 bp.

**Tabelle 2.19 PCR-Bestandteile für die Amplifikation der cDNA aus dem Ribosomen-Display**

Bestandteil	Menge
Template [cDNA]	5 µL
Primer [895F / 894R]	1 µL / 1 µL
dNTP Mix (10 mM)	4 µL
DMSO	2 µL

<b>MgCl<sub>2</sub> (100 mM)</b>	2 µL
<b>miPfu-Puffer (10×)</b>	5 µL
<b>miPfu-Polymerase</b>	0,8 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	ad 50 µL

Das für die Amplifikation der cDNA aus dem Ribosomen-Display verwendete PCR-Programm ist analog zu dem der Fusions-PCR (Tabelle 2.18).

#### 2.2.3.3 Amplifikation der IRS1-PTB und Mutante-1

Zur Klonierung des IRS1-PTB-*Wildtyps* und Mutante-1 in den Expressions-Vektor pET41b\_*PreScission* (Kapitel 2.1.3) musste die DNA zunächst amplifiziert werden. Dabei wurden eine *Bam*HI- sowie eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle in das 361 bp-große DNA-Fragment eingefügt

**Tabelle 2.20 PCR-Bestandteile für die Amplifikation des IRS1-PTB-*Wildtyps* und Mutante-1**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>Template [BC 934 bzw. *]</b>	1 µL
<b>Primer [1015F / 1016R]</b>	1 µL / 1 µL
<b>dNTP Mix (10 mM)</b>	4 µL
<b>DMSO</b>	1 µL
<b>MgCl<sub>2</sub> (100 mM)</b>	2 µL
<b>miPfu-Puffer (10×)</b>	5 µL
<b>miPfu-Polymerase</b>	0,8 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	ad 50 µL

\* Mutante-1 im *TOPO*-Vektor

**Tabelle 2.21 PCR-Programm für die Amplifikation des IRS1-PTB-*Wildtyps* und Mutante-1**

<b>Temperatur [° C]</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Zyklen-Anzahl</b>
<b>95</b>	2:00	1
<b>95</b>	0:30	35
<b>55</b>	0:45	
<b>72</b>	1:00	
<b>72</b>	5:00	1
<b>8</b>	-	

#### 2.2.3.4 Amplifikation von Histatin1

Zur Klonierung von Histatin1 in den Expressions-Vektor pET-SUMOadapt (Kapitel 2.1.3) musste die DNA zunächst amplifiziert werden. Dabei wurden eine *Bsa*I- sowie eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle in das 147 bp-große DNA-Fragment eingefügt



Tabelle 2.22 PCR-Bestandteile für die Amplifikation von Histatin1

Bestandteil	Menge
Template [BC 1121]	2 µL
Primer [2116F / 2117R]	5 µL / 5 µL
dNTP Mix (10 mM)	4 µL
X-Pfu-Puffer (10×)	10 µL
X-Pfu-Polymerase	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 µL

Tabelle 2.23 PCR-Programm für die Amplifikation von Histatin1

Temperatur [° C]	Zeit [min]	Zyklen-Anzahl
95	2:00	1
95	0:40	5
57	0:30	
74	0:20	
95	0:40	25
72	0:30	
74	0:20	
74	5:00	1
8	-	

### 2.2.3.5 Kolonie-PCR

Zur Identifikation positiver Klone nach der *TOPO*-Klonierung (Kapitel 2.2.4.3) wurde mithilfe einer Kolonie-PCR die Größe des Inserts bestimmt. Dazu wurden Klone von der Platte gepickt und in 20 µL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die eine Hälfte der Suspension wurde für eine optionale Kultivierung aufbewahrt und die andere Hälfte für die Kolonie-PCR verwendet. Dabei zeichnete sich ein positiver Klon durch ein 948 bp-großes PCR-Produkt aus, während dagegen bei einer lediglich den Leervektor beinhaltenden Kolonie nur ein 209 bp-großes Fragment entstand.

Tabelle 2.24 PCR-Bestandteile für die Amplifikation des *TOPO*-Vektors

Bestandteil	Menge
Template [*]	10 µL
Primer [2060F / 2061R]	1 µL / 1 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
DreamTaq-Puffer (10×)	2,5 µL
dreamTaq-Polymerase	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µL

\* beliebiger Klon aus der *TOPO*-Klonierung

Tabelle 2.25 PCR-Programm für die Amplifikation des *TOPO*-Vektors

Temperatur [° C]	Zeit [min]	Zyklen-Anzahl
95	0:30	1
95	0:30	3
46	0:30	
72	0:30	
95	0:40	32
49	0:30	
72	0:30	
72	5:00	1
8	-	

## 2.2.4 Klonierung

Durch den Vorgang der Klonierung kann ein ausgewähltes DNA-Fragment in einen Vektor integriert werden. Dazu wird dieses zunächst unter Einbringung von Restriktions-Schnittstellen amplifiziert (Kapitel 2.2.3). Anschließend werden dieses sogenannte *Insert* und der Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und daraufhin ligiert.

### 2.2.4.1 Klonierung der IRS1-PTB und Mutante-1 in pET41b\_*PreScission*

Für die Klonierung der IRS1-PTB sowie Mutante-1 in den Vektor pET41b\_*PreScission* wurden das zuvor erzeugte DNA-Fragment (Kapitel 2.2.3.3) und der Vektor mit *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und anschließend ligiert.

Tabelle 2.26 Restriktions-Ansatz zur Klonierung der IRS1-PTB sowie Mutante-1

Bestandteil	Vektor (1 µg)	Insert (200 ng)
IRS1-PTB-/Mutante-1-Fragment	- µL	3,6 µL
pET41b_ <i>PreScission</i>	2,2 µL	- µL
FastDigest-Puffer (10×)	4 µL	3 µL
<i>Bam</i> HI (fast digest)	2 µL	1 µL
<i>Xho</i> I (fast digest)	2 µL	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 40 µL	ad 30 µL

Tabelle 2.27 Ligations-Ansatz zur Klonierung der IRS1-PTB sowie Mutante-1

Bestandteil	Menge
IRS1-PTB-/Mutante-1-Fragment	9 ng = 1 µL
pET41b_ <i>PreScission</i>	50 ng = 15,3 µL
T <sub>4</sub> -Ligase-Puffer (10×)	2 µL
T <sub>4</sub> -Ligase	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

### 2.2.4.2 Klonierung von Histatin1 in pET-SUMOadapt

Für die Klonierung von Histatin1 in den Vektor pET-SUMOadapt wurden das zuvor erzeugte DNA-Fragment (Kapitel 2.2.3.4) und der Vektor mit *BsaI* und *BamHI* geschnitten und anschließend ligiert.

**Tabelle 2.28 Restriktions-Ansatz zur Klonierung von Histatin1**

Bestandteil	Vektor (1 µg)	Insert (200 ng)
Histatin1-Fragment	- µL	13,5 µL
pET-SUMOadapt	10 µL	- µL
NEB-Puffer 3 (10×)	5 µL	5 µL
BSA	0,5 µL	0,5 µL
<i>BsaI</i>	1 µL	1 µL
<i>BamHI</i>	1 µL	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL	ad 50 µL

**Tabelle 2.29 Ligations-Ansatz zur Klonierung von Histatin1**

Bestandteil	Menge
Histatin1-Fragment	100 ng = 1 µL
pET-SUMOadapt	21 ng = 1 µL
T <sub>4</sub> -Ligase-Puffer (10×)	2 µL
T <sub>4</sub> -Ligase	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

### 2.2.4.3 TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung wurde mithilfe des TOPO®-TA-cloning Kits von Life Technologies durchgeführt. Dabei besitzt der aktivierte pCR2.1-TOPO-Vektor 3'-Thymin-Überhänge, so dass das generierte PCR-Produkt mit seinen 5'-Adenin-Überhängen sofort ligiert werden kann.

### 2.2.5 Zielgerichtete Mutagenese

Die Zielgerichtete Mutagenese erlaubt den Austausch einzelner Basen in einer Nukleotid-Sequenz. Dabei wird ein mutagenes Primer-Paar eingesetzt um die gewünschte Veränderung an der doppelsträngigen Plasmid-DNA vorzunehmen. Durch den anschließenden Verdau des resultierenden Produkts mit *DpnI*, bleibt in der Folge nur die nicht-methylierte neu synthetisierte DNA erhalten.

Zur Generierung von Mutante-2 und Mutante-3 aus der zuvor klonierten Mutante-1 (Kapitel 2.2.4.1), wurde die Zielgerichtete Mutagenese mithilfe des QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits von Agilent Technologies realisiert.

Tabelle 2.30 *Quick-Change*-Ansatz zur Generierung von Mutante-2 und -3

Bestandteil	Menge
Mutante-1 in pCR2.1-TOPO	0,5 µL
Primer [2078F / 2079R] *	1 µL / 1 µL
dNTP-Mix	1 µL
Reaktions-Puffer (10×)	5 µL
QuickSolution Reagenz	1,5
QuickChange Lightning Enzym	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

\*bzw. [2080F / 2081R]

## 2.2.6 DNA-Transformation

Die Transformation von DNA in *E. coli* wurde zur Überprüfung der Klonierung (Kapitel 2.2.4) und zur Einbringung von DNA in Expressions-Stämme genutzt. Dabei wurde in der Regel eine Transformation in elektrokompente *E. coli*-Zellen vorgenommen, mit Ausnahme des Stamms BL21(DE3)-T1<sup>R</sup>, welcher eine chemische Transformation benötigt.

### 2.2.6.1 Transformation in elektrokompente *E. coli*-Zellen

Zur Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst ein 40 µL-Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und mit der entsprechenden Menge an DNA vermischt. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette gegeben, elektroporiert und sofort in ein Reaktionsgefäß mit 300 µL vorgewärmten SOC-Medium überführt. Der Transformations-Ansatz wurde bei 300 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert.

### 2.2.6.2 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst ein 40 µL-Aliquot mit der entsprechenden Menge an DNA für 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 45 s bei 42 °C einem Hitze-Schock ausgesetzt und umgehend wieder auf Eis inkubiert. Nach 2 min wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß mit 300 µL vorgewärmten SOC-Medium überführt und bei 300 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung

#### 2.3.1.1 Kultur von *E. coli*

*E. coli*-Flüssigkulturen wurden durch Glycerin-Kulturen oder eine aus dem Transformations-Ansatz entstandene Kolonie beimpft und in dem entsprechenden Medium und ggf. mit dem jeweiligen Antibiotikum bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert.

### 2.3.1.2 Kultur von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae*-Flüssigkulturen wurden durch Kolonien von der Platte angeimpft und in DMSZ-Medium bei 30 °C im Schüttelinkubator kultiviert.

### 2.3.1.3 Kultur von TR146

Die humane Zelllinie TR146 wurde in mit FCS, MEM und Penicillin-Streptomycin versetztem DMEM in Zellkulturflaschen bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wuchsen bis zur nahen Konfluenz und wurden dann mithilfe von Trypsin vom Flaschenboden gelöst und anhand einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden sie entweder erneut ausgesät oder in der gewünschten Zelldichte im Wundheilungs-Assay eingesetzt.

## 2.3.2 Expression

Die Expression des GST-IRS1-PTB-Konstruktes sowie der drei Mutanten erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3)-T1<sup>R</sup>. Das His-tag-SUMO-Histatin1-Konstrukt wurde in *E. coli* C43 DE3 exprimiert.

### 2.3.2.1 Expressions-Test

Zur Optimierung der Expressions-Bedingungen, wurde das entsprechende Konstrukt in den zugehörigen *E. coli*-Stamm transformiert (Kapitel 2.2.6) und bei 37 °C ÜN auf LB-Selektivplatten inkubiert. Anschließend wurde mithilfe einer Kolonie eine Flüssigkultur angezogen und diese nach 18 h zur 1-2 %igen Beimpfung einer Haupt-Kultur verwendet. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde die Expression durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert.

Für den Expressions-Test wurden sowohl verschiedene Expressions-Temperaturen als auch eine unterschiedliche Expressions-Dauer getestet. Dabei wurden Temperaturen zwischen 18 °C und 37 °C bei einer Inkubations-Zeit von in der Regel 3 h, 6 h und 18 h geprüft. Die Hauptkultur besaß ein Volumen von 50 mL je Temperatur und wurde zu jedem der drei Zeitpunkte um 10 mL verkleinert. Gleichzeitig wurde eine Kontroll-Expression ohne IPTG-Induktion durchgeführt.

Die entnommenen Proben wurden bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert und das entstandene Bakterien-Pellet bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Pellets in dem zugehörigen Basispuffer resuspendiert und mit 1 mM PMSF versetzt. Der Zellaufschluss fand mithilfe einer Ultraschall-Sonde durch 3-malige 30-sekündige Sonifizierung bei 30 % Intensität statt. Anschließend wurde für eine 1 h bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert, um die löslichen Bestandteile im Überstand von den unlöslichen zu trennen. Vom Überstand wurden 20 µL abgenommen und mit der gleichen Menge an 2-fachem Probenpuffer (SDS- oder Tris/Tricin-Probenpuffer) versetzt. Der Rest des Überstands wurde verworfen und das verbleibende Pellet wiederum in 500 µL des entsprechenden Basispuffers resuspendiert. Von dieser Suspension wurden ebenfalls 20 µL abgenommen und mit Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden alle generierten Proben durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Für einen Expressions-Test in M9-Phosphatmedium wurde zunächst eine Vorkultur beimpft und diese bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 zur Beimpfung der Hauptkultur in Minimalmedium verwendet. Die weiteren Schritte verliefen analog.

#### 2.3.2.2 Expression der IRS1-PTB und Mutante-1 bis -3

Die Expression des GST-IRS1-PTB bzw. GST-Mutante-X-Fusionsproteins erfolgte auf Basis der im Expressions-Test optimierten Bedingungen.

Eine ÜN-Kultur aus 30 mL LB-Medium wurde aus einer Glycerin-Kultur beimpft und bei 160 rpm und 37 °C ÜN inkubiert. Mit 1-2 % dieser Kultur wurden nachfolgend vier 5 L-Kolben beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert. Anschließend wurde mit 0,75 mM IPTG induziert und die Zellen nach einer Expression von 18 h bei 30 °C zentrifugiert. Die Bakterien-Pellets wurden in GST-Basispuffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.3.2.3 Expression von Histatin1

Die Expression des mit einem N-terminalen His-tag versehenen SUMO-Histatin1-Fusionsproteins erfolgte auf Basis der im Expressions-Test optimierten Bedingungen.

Eine ÜN-Kultur aus 30 mL LB-Medium wurde mit einer Kolonie von der Platte beimpft und bei 160 rpm und 37 °C ÜN inkubiert. Mit 1-2 % dieser Kultur wurden nachfolgend vier 5 L-Kolben beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert. Anschließend wurde mit 0,75 mM IPTG induziert und die Zellen nach einer Expression von 6 h bei 37 °C zentrifugiert. Die Bakterien-Pellets wurden in GST-Basispuffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Im Falle der Expression von <sup>15</sup>N-markiertem Fusionsprotein wurde mithilfe der ÜN-Kultur eine 1 L-Vorkultur beimpft und diese bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 schonend zentrifugiert. Das entstandene Bakterien-Pellet wurde in M9-Phosphatmedium resuspendiert und auf vier 5 L-Kolben mit je 1 L Minimalmedium aufgeteilt. In diesen wurde dann die Expression in bekannter Weise durchgeführt.

### 2.3.3 Toxizitäts-Assay

Der Toxizitäts-Assay richtete sich gegen *S. cerevisiae* und wurde zur Bestimmung der antifungalen Aktivität von Histatin1 und seinen Fragmenten eingesetzt. Dafür wurden vor und nach Inkubation mit den entsprechenden Peptiden 10 µL einer Hefen-Suspension abgenommen und ausplattiert. Anschließend wurde durch Zählen der Kolonien der Effekt auf das Wachstum bestimmt.

Zunächst wurde eine *S. cerevisiae*-Flüssigkultur (Kapitel 2.3.1.2) erstellt, welche bei 180 rpm und 30 °C ÜN inkubiert wurde. Aus dieser wurde 2 %ig eine Zwischen-Kultur beimpft, welche nur für einen Zeitraum von 1,5 h im Inkubator verblieb. Diese bildete anschließend die Ausgangs-Kultur für den Toxizitäts-Assay. So wurde sie als Basis für serielle Verdünnungsreihen in einer 96-Wellplatte eingesetzt, wobei zur späteren Kontrolle der aus dem Assay hervorgehenden Werte sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Richtung verdünnt wurde.

Zu Beginn befanden sich 80 µL Hefen-Suspension in einem Well, von denen 10 µL für die Probe zum Zeitpunkt T=0 ausplattiert wurden. Durch die Zugabe von 10 µL des jeweiligen Peptids wurden anschließend weiterhin 80 µL Hefen-Suspension für 3 h bei 30 °C inkubiert. Nachfolgend wurde eine 10 µL-Probe zum Zeitpunkt T=3 entnommen und ausplattiert. Durch den Vergleich der Zellzahlen vom Zeitpunkt T=0 und T=3 konnte so ggf. ein inhibitorischer Effekt im Vergleich zur Kontrolle (Gelfiltrationspuffer) nachgewiesen werden.

### 2.3.4 Wundheilungs-Assay

Mithilfe des Wundheilungs-Assays sollte die Wirkung von Histatin1 und seinen Fragmenten auf die Zell-Migration nachgewiesen werden. Dabei wurde die Zelllinie TR146 zunächst bis zur Konfluenz kultiviert (Kapitel 2.3.1.3) und anschließend mechanisch eine Wunde generiert. Anhand der Größen-Differenz zwischen der Wunde zu Beginn und nach 10 h Inkubation ließ sich dementsprechend eine Aussage über die Wundheilungs-Eigenschaften des jeweiligen Peptids im Vergleich zu Kontrolle machen.

Für den Wundheilungs-Assay wurde das *Oris™ Cell Migration Assay Kit* der Firma *Platypus Technologies* verwendet, wobei dieses insbesondere aus einer 96-Wellplatte mit einem in jedes Well integrierten Stempel bestand. Durch Ziehen dieses Stempels wurde die benötigte Wunde generiert und besaß dementsprechend eine einheitliche Größe in allen Wells.

Die kultivierten TR146-Zellen wurden zunächst durch Trypsinierung vereint und nach Bestimmung der Gesamt-Zellzahl etwa  $2,5 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 120 µL in jedes Well eingebracht. Im Anschluss daran wurden die Zellen 48 h bei 37 °C kultiviert. Nach Ziehen des Stempels wurden je Well 5 µL des entsprechenden Peptids hinzugegeben und die Platte für weitere 10 h inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und nach 3-maligem Waschen mit PBS-Puffer mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33258 inkubiert. Dieser ermöglichte eine mikroskopische Visualisierung der Zellen, so dass durch Integration der frei gebliebenen Flächen und Vergleich mit den Kontroll-Wells eine Aussage zu den Wundheilungs-Eigenschaften des jeweiligen Peptids gemacht werden konnte.

## 2.4 Biochemische Methoden

---

### 2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dabei erhalten diese durch SDS im Probenpuffer eine einheitliche negative Netto-Ladung und wandern so geschlossen von der Anode zur Kathode. Durch die gleichzeitige Verwendung von Protein-Markern definierter Größe ist das Molekulargewicht der zu bestimmenden Probe nach Färbung des Gels mit einer Coomassie-Lösung ablesbar. Je nach Größe der Proteine ist dabei ggf. eine Tris/Tricin-PAGE der klassischen SDS-PAGE vorzuziehen.

### 2.4.1.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE basiert auf einem Polyacrylamid-Gel, welches ein Sammelgel und ein Trenngel nach Laemmli beinhaltet. Bei Anlegen der Spannung durchwandern die Proteine das Sammelgel und konzentrieren sich an der Grenze zum Trenngel, wo aufgrund der Änderung des pH-Werts die Größen-spezifische Auftrennung beginnt.

In Tabelle 2.31 ist die Zusammensetzung der beiden Gele zusammengestellt.

**Tabelle 2.31 Zusammensetzung des 12,5 %igen SDS-Gels**

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>AA/Bis Rotiphorese® Gel 30</b>	3,75 mL	255 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	1,95 mL	1,05 µL
<b>Trenngel-Puffer</b>	1,65 mL	- µL
<b>Sammelgel-Puffer</b>	- mL	150 µL
<b>10 % SDS</b>	75 µL	15 µL
<b>10 % APS</b>	75 µL	15 µL
<b>TEMED</b>	2,5 µL	15 µL

Nach Auftrag der mit Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben, erfolgte die Auftrennung bei einer konstanten Stromstärke von 44 mA. Anschließend wurden die Gele mit der Coomassie-Färbelösung sowie der Entfärbelösung inkubiert, um die Banden der aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen.

Die SDS-PAGE wurde insbesondere zur Größen-Bestimmung der IRS1-PTB-Domäne und ihrer Mutanten verwendet, während für Histastin1 aufgrund seines geringen Molekulargewichts auf Tris/Tricin-Gele zurückgegriffen werden musste.

### 2.4.1.2 Tris/Tricin-PAGE

Die Tris/Tricin-PAGE nach Tschägger und Jagow [193] eignet sich vor allem zur Größen-Bestimmung kleiner Proteine ( $\leq 20$  kDa), wie etwa von Histatin1.

Zusätzlich zu Sammelgel und Trenngel enthalten Tschägger-Jagow-Gele eine mittig angeordnete *Spacer*-Schicht. Die zugehörige Zusammensetzung der Gele kann Tabelle 2.32 entnommen werden.

**Tabelle 2.32 Zusammensetzung des Tris/Tricin-Gels**

	<b>Trenngel</b>	<b>Spacer-Gel</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>AA/Bis Rotiphorese® Gel 30</b>	4,2 mL	1,66 mL	1 mL
<b>Gel-Puffer</b>	3,5 mL	1,75 mL	1,25 mL
<b>Glycerin (86 %)</b>	1,66 mL	- mL	- µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	0,58 mL	1,56 mL	2,72 mL
<b>10 % APS</b>	50 µL	25 µL	25 µL
<b>TEMED</b>	10 µL	10 µL	10 µL



Die Elektrophorese wurde je nach aktuellem Gel bei unterschiedlichen angelegten Spannungen durchgeführt. So wanderten die Proben bei einer konstanten Spannung von 30 V durch das Sammelgel und bei 70 V durch das Spacer-Gel, während bei Erreichen des Trenngels 150 V eingestellt wurden. Im Anschluss an die Tris/Tricin-*PAGE* wurde das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in Entfärber inkubiert bis Proteine in Form von blauen Banden erkennbar waren.

## 2.4.2 Zellaufschluss

Die nach der Kultivierung bei -20 °C gelagerten Bakterien-Pellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Lysozym [5 mg/mL] sowie dem Protease-Inhibitor PMSF [10 µL/mL] versetzt. Die Bakterien-Suspension wurde für etwa 30 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Kavitation mithilfe einer Ultraschall-Sonde auf Eis aufgeschlossen (6-malige Sonifizierung für 30 s bei 60 % Intensität). Die entstandene Suspension aus Zellresten und Proteinen wurde mit 35000 rpm für 75 min bei 4 °C Ultra-zentrifugiert und der die löslichen Proteine enthaltende Überstand abgenommen. Dieser wurde anschließend filtriert und für die entsprechende Protein-Reinigung verwendet.

## 2.4.3 Protein-Reinigung

### 2.4.3.1 Reinigung der IRS1-PTB sowie Mutante-1 bis -3

Die Reinigung des Fusionsproteins, bestehend aus N-terminalem GST-*tag* und der IRS1-PTB-Domäne, wurde durch eine Affinitäts-Chromatographie realisiert. Dabei wurde die Affinität von Glutathion-S-Transferase (GST) zu dem an einer Säulen-Matrix immobilisierten Glutathion (GSH) genutzt. Die spätere Elution erfolgte mithilfe von löslichem, reduziertem Glutathion.

Das nach dem Zell-Aufschluss erhaltene, filtrierte Protein-Gemisch wurde auf die mit GST-Basispuffer äquilibrierte Säule gegeben und unspezifisch bindende Verunreinigungen mithilfe des GST-Hochsalzpuffers beseitigt. Zur Elution wurde der Glutathion-haltige GST-Elutionspuffer verwendet. Das zugehörige Protokoll der Reinigung ist in Tabelle 2.33 aufgeführt.

**Tabelle 2.33 Protokoll der Reinigung von GST-IRS1-PTB sowie GST-Mutante-1 bis -3**

	Verwendeter Puffer	Flussrate	Volumen
<b>Äquilibration</b>	GST-Basispuffer	2 mL/min	50 mL
<b>Auftrag</b>		1 mL/min	x mL
<b>Waschschritt 1</b>	GST-Basispuffer	1 mL/min	30 mL
<b>Waschschritt 2</b>	GST-Hochsalzpuffer	1 mL/min	90 mL
<b>Waschschritt 3</b>	GST-Basispuffer	1 mL/min	30 mL
<b>Elution</b>	GST-Elutionspuffer	1 mL/min	90 mL

Während der Elutions-Schritte wurde die eluierte Protein-Lösung fraktioniert gesammelt. Die das Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden zusammengeführt und konzentriert.

Anschließend wurde das Fusionsprotein in ein Reaktionsgefäß überführt und mit der *PreScission*-Protease [1 mg/mL] versetzt. Nach Inkubation bei 4 °C ÜN wurde die Protein-Lösung für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und mittels einer Spritze direkt auf die mit Gelfiltrations-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Die Elution wurde fraktioniert gesammelt und die die IRS1-PTB-enhaltenden Fraktionen vereinigt und konzentriert.

#### 2.4.3.2 Reinigung von Histatin1

Die Reinigung des Fusions-Proteins, bestehend aus dem *SUMO*-Protein mit N-terminalem *His-tag* und Histatin1, wurde mithilfe einer *His-tag-IMAC* (*immobilized metal ion affinity chromatography*) durchgeführt. Diese beruht auf der Affinität zwischen dem aus sechs Histidinen bestehenden *His-tag* und zweifach positiv geladenen Nickel-Ionen, welche über Nitriloessigsäure (NTA) in einem oktaedrischen Komplex an das Trägermaterial der Säule gebunden sind. Dabei erfolgt die Bindung des Histidin-Hexamers mit hoher Selektivität durch Bildung eines stabilen Metall-Chelat-Komplexes. Die Elution des Proteins wird durch Imidazol eingeleitet, indem dieses das Hexamer kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt.

Das nach dem Zell-Aufschluss erhaltene, filtrierte Protein-Gemisch wurde auf die mit His-Basispuffer äquilibrierte Säule gegeben und mithilfe des His-Hochsalzpuffers gewaschen. Zur Elution wurde der Imidazol-haltige His-Elutionspuffer in Form eines Stufen-Gradienten eingesetzt. Dabei wurden zunächst unspezifisch bindende Verunreinigungen mit 10 % His-Elutionspuffer entfernt und das *His-tag-SUMO*-Histatin1 anschließend bei 75 % His-Elutionspuffer eluiert. Das zugehörige Protokoll der Reinigung ist in Tabelle 2.34 aufgeführt.

**Tabelle 2.34 Protokoll der Reinigung von Histatin1**

	Verwendeter Puffer	Flussrate	Volumen
<b>Äquilibration</b>	His-Basispuffer	2 mL/min	50 mL
<b>Auftrag</b>		1 mL/min	x mL
<b>Waschschritt 1</b>	His-Basispuffer	2 mL/min	50 mL
<b>Waschschritt 2</b>	His-Hochsalzpuffer	2 mL/min	50 mL
<b>Waschschritt 3</b>	His-Basispuffer	2 mL/min	50 mL
<b>Elution 1</b>	His Basispuffer (90 %) His-Elutionspuffer (10 %)	1 mL/min	30 mL
<b>Elution 2</b>	His-Basispuffer (25 %) His-Elutionspuffer (75 %)	1 mL/min	60 mL

Während der Elutions-Schritte wurde die eluierte Protein-Lösung fraktioniert gesammelt. Die das Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden zusammengeführt, konzentriert und in Protease-Puffer diafiltriert. Anschließend wurde das Fusionsprotein in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mM DTT und 20 µL *SUMO*-Protease [5 mg/mL] versetzt. Nach Inkubation bei 4 °C ÜN wurde die Protein-Lösung für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und mittels einer Spritze direkt auf die mit Gelfiltrations-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Die Elution wurde fraktioniert gesammelt und die Histatin1-enhaltenden Fraktionen vereint und konzentriert.

### 2.4.4 Analytische Gelfiltration

Mithilfe einer analytischen *SEC* (*size exclusion chromatography*) lässt sich im Vergleich mit einem Größenstandard aus bekannten Proteinen die Größe eines zu untersuchenden Proteins abschätzen. Dabei benötigen kleinere Proteine länger für die Durchquerung der Säule als große, da sie die Möglichkeit besitzen in die Poren der Säulen-Matrix zu diffundieren. Somit ergibt sich eine direkte Korrelation von Elutionsvolumen und Molekulargewicht.

Die analytische Gelfiltration wurde mit einer *Superdex Peptid (30 pg) 10/300 GL* an der *Äkta* FPLC-Anlage bei 4 °C durchgeführt. Dazu wurde ein 50 µL-Probenschlauch verwendet und über 60 mL mit 0,5 mL/min eluiert. Alle Durchläufe wurden in identischem Gelfiltrations-Puffer durchgeführt. Als Kalibrationslauf wurden zunächst Proteine und Substanzen bekannter Größe eingesetzt, die Tabelle 2.35 entnommen werden können.

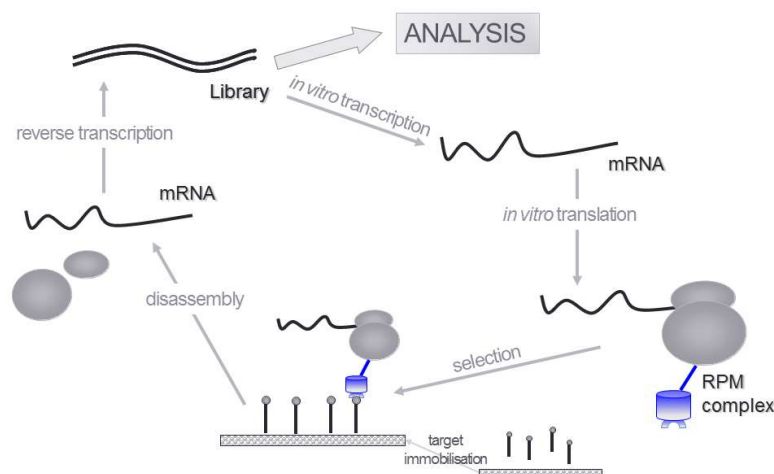
**Tabelle 2.35 Proteine und Substanzen des Kalibrationslaufs der analytischen SEC**

Substanz	Konzentration	Größe
<b>Ribonuclease A</b>	1 mg/mL	13700 Da
<b>Aprotinin</b>	2 mg/mL	6511 Da
<b>Vitamin B<sub>12</sub></b>	0,5 mg/mL	1355 Da
<b>L-Tryptophan</b>	5 mg/mL	204 Da

Anschließend wurde synthetisches Histatin1 in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und sein experimentell ermitteltes Molekulargewicht mithilfe der Regressionsgeraden bestimmt.

### 2.4.5 Ribosomen-Display

Beim Ribosomen-Display handelt es sich um ein Zell-freies System für die *in vitro* Selektion von Proteinen und Peptiden aus den entsprechenden Bibliotheken. Dabei wird das entstehende Protein (Phänotyp) an seine zugehörige RNA (Genotyp) durch die Bildung stabiler ribosomaler Komplexe gekoppelt (Abbildung 2.3, nach [194]).



**Abbildung 2.3 Ablauf des Ribosomen-Displays, nach [194]**

Dargestellt ist ein Selektions-Zyklus im Verlauf eines Ribosomen-Displays. Dabei kann die gewonnene DNA entweder für einen weiteren Zyklus eingesetzt oder analysiert werden.

Der erste Schritt im Ribosomen-Display ist die Amplifikation der DNA-Bibliothek, wobei eine Promotor-Sequenz sowie die Ribosomen-Bindungsstelle angefügt werden. Gleichzeitig erhält das Fragment einen C-terminalen *Linker*, welcher die Faltung der Bibliotheks-Proteine ermöglicht, während er selbst im ribosomalen Tunnel verbleibt. Im nächsten Schritt erfolgt die *in vitro*-Transkription in mRNA sowie die sofortige *in vitro*-Translation. Diese wird durch die Bildung der stabilen, ternären Komplexe aus mRNA, Ribosom und entstehendem Protein gestoppt, wobei die Komplexe direkt für die Bindungs-Selektion an einem immobilisierten Liganden eingesetzt werden können. Im Anschluss daran wird die mRNA der gebundenen Komplexe durch Dissoziation des Ribosoms mithilfe von EDTA extrahiert und durch eine Reverse Transkriptase-Reaktion in DNA umgewandelt. Diese cDNA wird mittels PCR vervielfältigt und für einen neuen Selektions-Zyklus eingesetzt bzw. analysiert.

Zunächst wurde die Bibliothek auf Basis der IRS1-PTB-Domäne mit angehängtem Gen III (211-299) amplifiziert (Kapitel 2.2.3.1). Anschließend wurden mithilfe des *PURExpress*<sup>®</sup> *in vitro protein synthesis Kits* von *NEB* die *in vitro*-Transkription und -Translation nach Herstellerangaben eingeleitet. Während der Inkubationszeit der *PURE*-Reaktion wurde die Peptid-Säule, bestehend aus einem Glasfilter mit 300 µL von IN<sub>s</sub>YYTSA-(Wang-Resin) bzw. INYYTSA-(Wang-Resin) mit Waschpuffer äquilibriert. Nach dem Stopp der Expression durch Zugabe von 200 µL Stopp-Puffer wurden die ribosomalen Komplexe für 1 h bei RT auf der Peptid-Säule inkubiert und anschließend 3-mal mit je 400 µL Waschpuffer sowie je 400 µL Hochsalzpuffer<sub>300</sub> und Hochsalzpuffer<sub>500</sub> von unspezifisch bindenden Verunreinigungen befreit. Die Elution der mRNA von gebundenen Komplexen erfolgte durch Zugabe je 400 µL Elutionspuffer<sub>2</sub> und Elutionspuffer<sub>20</sub>. Anschließend wurde die mRNA mithilfe des *NucleoTrap*<sup>®</sup> *mRNA Kits* von *Macherey Nagel* extrahiert und anhand des *Superscript*<sup>™</sup> *II Reverse Transkriptase Kits* von *Life Technologies* unter Verwendung des Primers 894R in cDNA umgewandelt. Diese wurde dann erneut amplifiziert (Kapitel 2.2.3.2).

Insgesamt wurde der Selektions-Zyklus 3-mal durchlaufen ehe die amplifizierte cDNA *TOPO*-kloniert wurde (Kapitel 2.2.4.3).

---

## 2.5 Biophysikalische Methoden

### 2.5.1 NMR-Spektroskopie

Das Prinzip der Kernresonanz-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) basiert auf magnetischen Kernresonanzen der zu untersuchenden Probe, wobei eine resonante Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment der Atomkerne in einem starken Magnetfeld mit einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld (Radiofrequenz-Puls) besteht. Dies betrifft allerdings nur magnetisch aktive Kerne und somit Isotope, deren Drehimpuls- oder Spinquantenzahl ein Vielfaches von ½ ist.

Die Resonanz kommt zustande, wenn der Radiofrequenzpuls die Rotationsfrequenz der Kernspins trifft und resultiert in einer veränderten Ausrichtung des Eigendrehimpulses. Die dabei absorbierte Energie wird über Relaxations-Prozesse wieder abgegeben, so dass das System in den energieärmeren Zustand der Gleichgewichts-Magnetisierung zurückfällt. Eben diese Änderung lässt sich mit geeigneter instrumenteller Anordnung messen, wobei die gemessenen Signale von der chemischen Umgebung des Atomkerns abhängig sind.

Anhand der Informationen, die solchen NMR-Experimenten entnommen werden können, lassen sich kovalent verknüpfte Atome innerhalb eines Proteins identifizieren. Zudem kann auch ihre geometrische Anordnung zueinander bestimmt werden. Außerdem lässt sich mithilfe des Kern-Overhauser-Effekts sogar die räumliche Nähe nicht kovalent miteinander verknüpfter Atome nachweisen, da diese über dipolare Wechselwirkungen miteinander interagieren.

#### 2.5.1.1 Probenvorbereitung und Messbedingungen

Für die Aufnahme von homonuklearen 2D-Spektren ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COESY) sowie des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQCs wurde synthetisches Histatin1 in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Dagegen wurde für die heteronuklearen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQCs zur Relaxations-Messung rekombinant hergestelltes  $^{15}\text{N}$ -markiertes Histatin1 in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Proben mit einem Endvolumen von 600  $\mu\text{L}$  befanden sich in NMR-Puffer und wurden mit 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  sowie 1  $\mu\text{L}$  30 mM DSS als interner Standard versetzt.

Alle NMR-Experimente wurden an einem *Bruker Ultrashield 700-NMR Spektrometer* bei einer Protonenfrequenz von 700 MHz durchgeführt. Dabei wurde als Probenkopf ein inverser Triple-Resonanz-Cryo-Probenkopf mit aktiv abgeschirmter Gradientenspule in alle drei Raumrichtungen verwendet und die Temperatur über eine BVT3000-Kontrolleinheit gesteuert. Das den Proben zugesetzte  $\text{D}_2\text{O}$  diene als interner Feldfrequenz-Lock.

Die verwendeten Puls-Programme entstammten der Bruker Standardbibliothek und sind in Tabelle 2.36 mit den zugehörigen Parametern aufgelistet.

**Tabelle 2.36 Parameter der verwendeten NMR-Spektren**

Experiment	Pulsprogramm	NS	Sweep width	Size of FID	Referenz
$^1\text{H}$	zgpr				
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY	cosygpprqf	64	F1 =10504,189 F2 =10504,202	F1 =512 F2 =2048	[195]
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY	dipsi2etgpsi19	128	F1 =11203,597 F2 =11160,714	F1 =512 F2 =2048	[196–198]
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY	noesygpqh19	128	F1 =10504,189 F2 =10504,202	F1 =512 F2 =2048	[196,197,199]
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC	sfhmqc3gpqh	800	F1 =2412,668 F2 =9803,922	F1 =512 F2 =1024	[200]
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC für $T_1$	hsqct1etf3gpsi.2	8	F1 =1986,909 F2 =9090,909	F1 =128 F2 =2048	
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC für $T_2$	hsqct1etf3gpsi	8	F1 =1986,909 F2 =9090,909	F1 =128 F2 =2048	

Die Spektren wurden mithilfe des Programms *Topspin 3.0* aufgenommen und prozessiert. Die FIDs (*free induction decays*) wurden vor der Fourier-Transformation in F2 auf eine Menge von 4096 Datenpunkten aufgefüllt (*zero filling*), um die digitale Auflösung zu verbessern. Als Filterfunktionen wurden  $\pi/4$ - bis  $\pi/2$ -verschobene Sinus- und Sinusquadrat-Funktionen verwendet [201]. Die Basislinienkorrektur wurde standardgemäß mit dem in *Topspin 3.0* implementierten *abs*-Befehl durchgeführt.

### 2.5.1.2 Struktur-Aufklärung

Die homonuklearen 2D-Spektren  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COESY wurden für die Zuordnung der Protonen im Peptid-Rückgrat und den Seiten-Ketten verwendet. Dabei wurde die Sequenzabfolge mittels *Chaintracing*-Verfahren ermittelt [202]. Die Signale im  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY wurden anschließend für die Struktur-Rechnung mit *Cyana 2.1* als Eingabe-Datei verwendet, wobei die Strukturrechnung mit dem automatischen NOE-Assignment kombiniert wird und über mehrere Zyklen läuft.

### 2.5.1.3 Relaxations-Messungen

Bei der Rückkehr der Kernspins in den Gleichgewichtszustand werden zwei Arten von Relaxationen unterschieden. So erfolgt die longitudinale Relaxation in Richtung des Haupt-Magnetfelds und wird mit der longitudinalen Relaxationszeit-Konstante  $T_1$  als diejenige Zeit angegeben, die benötigt wird um 63 % des Grundzustands nach Anregung zu erreichen. Dagegen beschreibt die transversale Relaxationszeit die zeitlich abnehmende Phasenkohärenz der Spins und wird durch die transversale Relaxationszeit-Konstante  $T_2$  angegeben. Beide Relaxations-Prozesse lassen sich mithilfe exponentieller Gesetze beschreiben (Formel 2.1).

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{\tau}{T}}$$

#### Formel 2.1 Signal-Intensitäten in Abhängigkeit der für die Relaxation verwendeten Zeit

$I$  = Intensität,  $I_0$  = Intensität im Grundzustand,  $\tau$  = Relaxationszeit in ms,  $T = T_1$  oder  $T_2$

Dabei kann das  $T_1$ - zu  $T_2$ -Verhältnis mit dem Molekulargewicht der Probe korreliert werden, was über die Berechnung der Rotations-Korrelations-Zeit dargestellt wird (Formel 2.2).

$$\tau_c = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \nu_N} \cdot \sqrt{6 \cdot \frac{T_1}{T_2} - 7}$$

#### Formel 2.2 Rotations-Korrelations-Zeit

$\nu_N$  = Resonanzfrequenz von  $^{15}\text{N}$  [Hz], beträgt bei 700 MHz (= 16,44 T)  $70,971 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$

Die Rotations-Korrelations-Zeit beschreibt dabei die Rotations-Diffusion von Partikeln in Lösung. Da sie die Dauer beschreibt, die ein Partikel benötigt um um ein Bogenmaß zu rotieren, ist die Rotations-Korrelations-Zeit von der Partikelgröße abhängig.

Für die Identifikation der Signale der Spektren aus den Relaxationsmessungen wurde das vollständig zugeordnete  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HSQC-Spektrum verwendet. Aus den Signal-

Intensitäten wurde die jeweilige Relaxationszeit mithilfe von CCPN und Formel 2.1 berechnet und die erhaltenen  $T_1$ - bzw.  $T_2$ -Zeiten über die Peptid-Sequenz gemittelt. Diese beiden Werte wurden anschließend zur Berechnung der Rotations-Korrelations-Zeit anhand von Formel 2.2 eingesetzt.

## 2.5.2 Fluoreszenz-Anisotropie-Assay

Das Prinzip der Fluoreszenz-Anisotropie basiert auf Photo Selektion. Diese beschreibt den Umstand, dass während der Anregung mit linear polarisiertem Licht, Fluorophore mit einem Absorptions-Dipol parallel zum elektrischen Vektor des linear polarisierten Lichts, bevorzugt angeregt werden. Während des angeregten Zustands rotiert das Fluorophor aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung, wobei der Grad der Rotation, bevor es zur Emission kommt, von der Lebensdauer des Fluorophors sowie seiner Rotations-Korrelationszeit abhängt. Ebenso wie die Anregung findet auch die Emission mit einem elektrischen Vektor parallel zum Emissions-Dipol des Fluorophors statt. Dementsprechend ist das emittierte Licht eines schnell rotierenden Fluorophors schwächer polarisiert als bei der Emission eines langsam rotierenden und somit besitzt letzteres eine höhere Anisotropie. Dies erklärt den Anstieg der Anisotropie bei Bindung eines Proteins an einen fluoreszierenden Liganden.

Die Anisotropie-Messungen zur Bestimmung der Bindungs-Affinität von der IRS1-PTB-Domäne sowie Mutante-1 bis -3 an MANT-IN<sub>S</sub>YYTSA-OH bzw. MANT-INYYTSA-OH wurden am Fluoreszenz-Spektrometer *Varian Cary Eclipse* durchgeführt, wobei das Probenvolumen 60  $\mu$ L in 3 mm Küvetten betrug. Die Proteinkonzentration wurde durch serielle Verdünnung variiert, während die Konzentration der fluoreszierenden Peptide konstant bei 12 mM lag. Alle weiteren Parameter der Messung sind Tabelle 2.37 zu entnehmen.

**Tabelle 2.37 Parameter zur Fluoreszenz-Anisotropie-Messung**

Parameter	Ausprägung
Anregungs-Wellenlänge	320 nm
Emissions-Wellenlänge	420 nm
Anregungs-Spalt	20 nm
Emissions-Spalt	20 nm
PMT-Spannung	600 V
Messzeit je Punkt	5 s
Temperatur	20 °C
G-Faktor	1,1373

Der G-Faktor wurde experimentell bestimmt um die unterschiedliche Transmissions-Effizienz der Polarisatoren für horizontal und vertikal polarisiertes Licht zu kompensieren.

Die aus den Anisotropie-Messungen gewonnenen Bindungskurven wurden mit *GraphPad Prism* [190] durch Auftragung des Anisotropie-Zuwachses gegen die Protein-Konzentration visualisiert und mithilfe eines Modells zur einseitigen spezifischen Bindung entsprechend Formel 2.3 gefittet.

$$\Delta r = \frac{r_{\max} \cdot [\text{Ligand}]}{K_d + [\text{Ligand}]}$$

**Formel 2.3 Einseitige spezifische Bindung**

$\Delta r$  = Anisotropie-Zuwachs,  $r_{\max}$  = Anisotropie-Zuwachs bei gesättigter Liganden-Konzentration,  
 $K_d$  = Bindungs-Konstante

## 2.6 Analytische und Chemische Methoden

---

### 2.6.1 Photometrische Konzentrations-Bestimmung

Die Bestimmung der DNA- und Protein-Konzentration wurde mithilfe von Ultraviolett-Absorptionsspektroskopie am Nanodrop (*Peqlab*) durchgeführt

#### 2.6.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Konzentrations-Bestimmung der DNA wurde das charakteristische Absorptions-Maximum bei 260 nm genutzt, mit welchem bereits die DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ L ausgegeben wurde.

#### 2.6.1.2 Bestimmung der Peptid- und Protein-Konzentration

Zur Konzentrations-Bestimmung der Peptide und Proteine wurde das Absorptions-Maximum der aromatischen Aminosäuren gemessen und mithilfe des anhand der Aminosäure-Zusammensetzung abgeschätzten Extinktions-Koeffizienten ( $e_{280}$  (IRS1-PTB) = 12490,  $e_{280}$  (Histatin1) = 7450) die Konzentration berechnet. Dafür wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz (Formel 2.4) verwendet [203].

$$E_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = e_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

**Formel 2.4 Lambert-Beer'sches Gesetz**

$I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichts [ $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ ];  $I$  = Intensität des Lichts nach Probendurchtritt [ $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ ];  
 $e_{\lambda}$  = molarer (dekadischer) Extinktionskoeffizient [ $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ] bei der Wellenlänge  $\lambda$ ;  $c$  = Konzentration der Probe [ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ];  $d$  = Weglänge des Lichts durch die Probe [ $\text{m}$ ]

### 2.6.2 Festphasen-Peptid-Synthese (SPPS)

Die SPPS (*solid phase peptide synthesis*) nach Merrifield [204] beinhaltet die kovalente Bindung der wachsenden Aminosäure-Kette an ein festes Träger-Polymer, wie etwa einen Polystyrol-Harz. Dabei erfolgt die Verknüpfung der einzelnen Aminosäure-Bausteine entgegen der biologischen Synthese-Richtung vom C- zum N-Terminus, wobei eine repetitive Sequenz aus Aminosäure-Kopplung, Entschützung der temporären Amino-Schutzgruppe und erneuter Aminosäure-Kopplung durchlaufen wird.

Der entscheidende Mechanismus der Festphasen-Peptid-Synthese besteht in der Reaktion einer N-terminal geschützten und an der  $\alpha$ -Carboxyl-Gruppe aktivierten Aminosäure mit der N-terminalen Aminosäure der entstehenden Polypeptid-Kette. Dabei entspricht die Schutzgruppe bei der basischen SPPS einer 9-Fluorenylmethylcarbonyl-Gruppe (Fmoc). Zusätzlich können die



Seitenketten der Aminosäure-Bausteine zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit einer tertiären Butanol-Schutzgruppe (tBu) versehen sein. Während der Synthese wird nach jeder Knüpfung einer Peptid-Bindung die Fmoc-Schutzgruppe mithilfe von Piperidin abgespalten. Gleichzeitig wird die Carboxyl-Gruppe der neu zu koppelnden Aminosäure mit HBTU in einen aktivierten Ester transformiert und so die Bildung einer neuen Peptid-Bindung ermöglicht. Die wachsende Peptid-Kette bleibt bis zu ihrer Fertigstellung kovalent an den Polymer-Träger gebunden. Anschließend wird mithilfe von TFA die Carboxyester-Verankerung vom Harz gelöst und die tBu-Schutzgruppen von den Seitenketten entfernt.

Zur Synthese der Peptide für das Ribosomen-Display sowie den Fluoreszenz-Anisotropie-Assay wurde ein Wang-Resin mit vorgekoppelten Fmoc-geschütztem Alanin eingesetzt. Dieses wurde in einem *Batch*-Reaktor zunächst 90 min in DMF quellen gelassen. Anschließend wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe des Alanins mithilfe von 2 mL Piperidin-Lösung (20 % v/v) für 15 min abgespalten. Zur Aktivierung des C-Terminus der zu koppelnden Aminosäure wurde diese mit 2 mL HBTU-Lösung [0,5 M] und 2 mL DIEA-Lösung [0,5 M] versetzt, homogenisiert und 10 min inkubiert. Anschließend wurde die N-terminal entschützte Peptid-Kette mit der aktivierten Aminosäure für 20 min inkubiert. Während der einzelnen Synthese-Schritte wurde über eine Vakuum-Pumpe im Dauerfluss mit DMF gespült um nicht bindende Aminosäuren sowie Nebenprodukte der Reaktionen zu beseitigen. Nach Kopplung der letzten Aminosäure wurde diese nochmals mit Piperidin entschützt und die Peptid-Resin-Verbindung in DMF resuspendiert sowie in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt.

Die Abspaltung des jeweiligen Peptids vom Wang-Resin erfolgte nach Zugabe einer 80 %igen TFA-Lösung für 30 min auf dem Schüttler. Anschließend wurde das Gemisch mit 15 ml Diethylether präzipitiert und bei 3000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das gebildete Pellet in 2 mL H<sub>2</sub>O gelöst sowie mithilfe eines Spritzenfilters filtriert.

### 2.6.3 LC-Massenspektrometrie

Die Identität der synthetisierten Peptide wurde Massenspektrometrisch mithilfe von LC-MS (*liquid chromatography mass spectrometry*) verifiziert. Dies ist ein an eine Flüssigkeits-Chromatographie gekoppeltes Verfahren zur Bestimmung des Masse-Ladungs-Verhältnisses. Dabei wird die zu untersuchende Substanz in die Gasphase überführt und ionisiert. Die ionisierten Teilchen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und dieser Teilchen-Strahl mithilfe eines Magnetfeldes abgelenkt, wobei sich aus der Stärke der Ablenkung die Masse des Teilchens ergibt.

Für die LC-MS-Messungen wurde zunächst in einem entsprechenden Probefläschchen 100 µL Acetonitril vorgelegt und mit 100 µL der Peptid-Lösung versetzt. Die experimentell bestimmte Masse wurde anschließend mit der theoretischen Masse des jeweiligen Peptids verglichen und bei erfolgreicher Synthese ggf. lyophilisiert.

#### 2.6.4 Präparative *Reversed-Phase*-HPLC

Zur Reinigung der synthetisierten Peptide für den Fluoreszenz-Anisotropie-Assay wurde eine präparative RP-HPLC (*reversed phase high pressure liquid chromatography*) durchgeführt. Bei dieser werden die Peptide unter hohem Druck durch die mit C<sub>18</sub>-Ketten beschichtete Säule gepresst und können durch hydrophobe Wechselwirkungen adsorbieren. Die Elution der Probe erfolgt anschließend über einen Gradienten mit steigender Acetonitril-Konzentration.

Zur Vorbereitung der Proben wurde 1 mL der entsprechenden Peptid-Lösung mit 1 mL Acetonitril versetzt und das Gemisch anschließend mithilfe einer Spritze in die Injektionsschleife der HPLC-Anlage von *Shimadzu* injiziert. Dabei wurde die Detektion der Peptid-Bindung über einen UV/Vis Detektor bei 214 nm realisiert. Zur Elution der Probe wurde ein Gradientensystem basierend auf Wasser und Acetonitril eingesetzt, welches zudem 0,1 % Trifluoroessigsäure enthielt. Die Elutions-Fractionen wurden mittels LC-MS analysiert und ggf. vereinigt.

## 3 ERGEBNISSE

### I Identifikation von CCR5-Bindern

Als erste Aufgabe sollten für eine Sequenz aus dem N-Terminus des CCR5-Rezeptors Binder mithilfe einer kombinatorischen Protein-Bibliothek identifiziert werden.

Dafür wurde zunächst die Bibliothek auf der Basis eines Protein-Gerüsts entwickelt und das gewählte Ziel-Peptid mittels Festphasen-Peptid-Synthese hergestellt. Die Selektion bindender Mutanten erfolgte mithilfe eines Ribosomen-Displays. Nach Identifikation der ausgewählten Mutanten wurden diese durch Klonierung oder zielgerichtete Mutagenese in einen Expressions-Vektor eingebracht. Anschließend wurden *Wildtyp* und Mutanten exprimiert und gereinigt. Zum Abschluss kamen sie in einem Fluoreszenz-Anisotropie-Assay zum Einsatz um ihre Bindungs-Affinität gegenüber der sulfatierten und nicht-sulfatierten Variante des Ziel-Peptids zu untersuchen.

#### 3.1 Entwicklung der Display-Komponenten

---

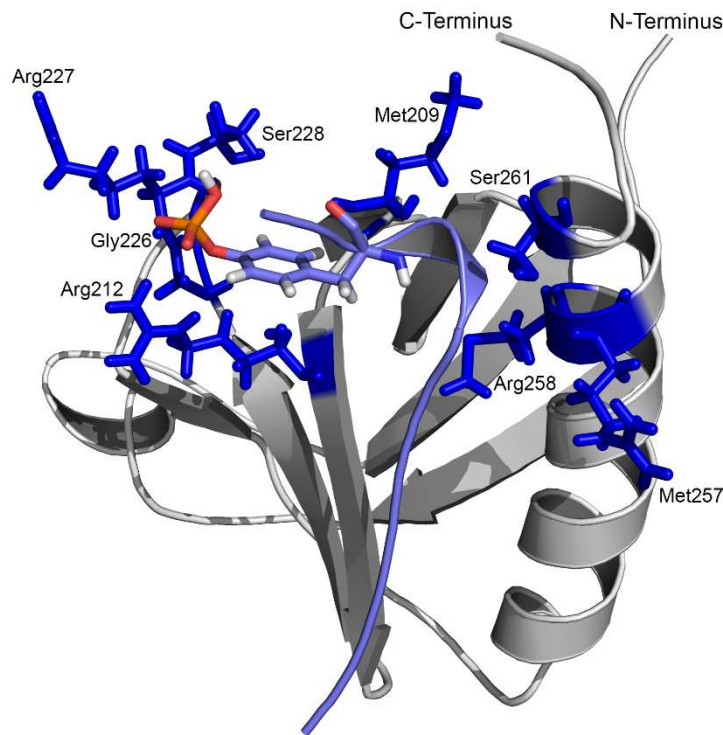
Um mithilfe des Ribosomen-Displays bindende Mutanten identifizieren zu können, mussten zunächst die erforderlichen Komponenten dafür entwickelt werden. Bei diesen handelte es sich zum einen um eine Protein-Bibliothek auf Basis der IRS1-PTB-Domäne und zum anderen um die sulfatierte und nicht-sulfatierte Variante eines 7-Aminosäuren-umfassenden Peptids aus dem N-Terminus des CCR5-Rezeptors.

##### 3.1.1 Design der Protein-Bibliothek

Zur Entwicklung der Protein-Bibliothek wurde als *Scaffold* (engl. Gerüst) die Phospho-Tyrosin-bindende Domäne des Insulin-Rezeptor-Substrats-1 (IRS1-PTB-Domäne) ausgewählt. Unter physiologischen Bedingungen besitzt die PTB-Domäne des IRS1 die Aufgabe eine Interaktion mit dem aktivierten Insulin-Rezeptor zu vermitteln. Dabei wird die Bindung durch die Erkennung phosphorylierter Tyrosine in der Juxtamembran-Region des Rezeptors eingeleitet [205–208]. Dementsprechend bestand die Idee hinter der Auswahl der IRS1-PTB-Domäne als Bibliotheks-*Scaffold* darin, aus einem Phospho-Tyrosin-Binder einen Sulfo-Tyrosin-Binder zu generieren.

Aus diesem Grund kamen als mögliche Mutations-Stellen nur diejenigen Aminosäuren in Frage, die möglicherweise an der Bindung des phosphorylierten Tyrosins beteiligt sind. Für die Bestimmung dieser Aminosäuren wurde die NMR-Struktur der IRS1-PTB-Domäne zur Hilfe genommen [209]. Diese zeigt die Lage eines Phospho-Peptids aus dem Interleukin-4-Rezeptor in der L-förmigen Oberflächen-Spalte zwischen den Faltblättern 5 und 6 sowie der C-terminalen Helix des Proteins. Die das Phospho-Tyrosin einrahmenden Aminosäuren befinden sich in den

umgebenden Faltblättern oder *Loops* sowie teilweise auch in der angrenzenden Helix. So wurden letztendlich 8 Aminosäuren für den Aufbau der kombinatorischen Bibliothek ausgewählt, deren Seitenketten die Bindungs-Umgebung für das phosphorylierte Tyrosin mitgestalten (Abbildung 3.1, modifiziert nach [209]).



**Abbildung 3.1 Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit den zu mutierenden Aminosäuren, modifiziert nach [209]**

Dargestellt ist die Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit ihrer 7-Strang-beta-Sandwich-Struktur, die von einer C-terminalen Helix abgeschlossen wird. Die ausgewählten Aminosäuren befinden sich im *Loop* zwischen Faltblatt 4 und 5 (Met209), in Faltblatt 5 selbst (Arg212), im *Loop* zwischen Faltblatt 6 und 7 (Gly226, Arg227, Ser228) und in der Helix (Met257, Arg258, Ser261).

Bei den ausgewählten Aminosäuren handelt es sich namentlich um Methionin 209, Arginin 212, Glycin 226, Arginin 227, Serin 228, Methionin 257, Arginin 258 und Serin 261. Übertragen auf die Primär-Sequenz der IRS1-PTB-Domäne wurden die zu mutierenden Aminosäuren entsprechend ihrer Reihenfolge mit X<sub>1</sub> - X<sub>8</sub> gekennzeichnet (Abbildung 3.2).

IRS1-PTB	<sup>156</sup> MGPAFKEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLCLTSKTISFVKLNSEAAAVV LQLMNIRRCGHSENFFFI EVGRSAVTGPGEFWMQVDDSVVAQNMHETILE AMRAMSDEF RPR <sup>267</sup>
IRS1-PTB (Bib)	<sup>156</sup> MGPAFKEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLCLTSKTISFVKLNSEAAAVV LQLX <sub>1</sub> NIX <sub>2</sub> RCGHSENFFFI EVX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> AVTGPGEFWMQVDDSVVAQNMHETILE AX <sub>6</sub> AMX <sub>7</sub> DEF RPR <sup>267</sup>

**Abbildung 3.2 Sequenz der IRS1-PTB-Domäne und der daraus hervorgehenden Protein-Bibliothek**

Die 112 Aminosäuren der IRS1-PTB-Domäne nehmen im Insulin-Rezeptor-Substrat-1 die Positionen 156-267 ein. Die ausgewählten Mutations-Stellen (blau) befinden sich dementsprechend an Position 209 (X<sub>1</sub>), 212 (X<sub>2</sub>), 226 (X<sub>3</sub>), 227 (X<sub>4</sub>), 228 (X<sub>5</sub>), 257 (X<sub>6</sub>), 258 (X<sub>7</sub>), und 261 (X<sub>8</sub>).

Nachdem die Bibliothek durch Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren auf Protein-Ebene designed worden war, mussten die entsprechenden Mutationen für ihre Erzeugung auf die

DNA-Ebene übertragen werden. Dafür wurden die für  $X_1$ - bis  $X_8$ -codierenden Basen-Triplets in NNK-Codons umgewandelt, wobei N für alle vier Kern-Basen und K lediglich für Guanin oder Thymin steht. Diese NNK-Codons besitzen den Vorteil, dass sie nur für eines von drei Stopp-Codons (TAG) codieren und daher die Wahrscheinlichkeit für einen frühzeitigen Abbruch der Protein-Expression verringern. Dabei besteht jedoch trotzdem für jede proteinogene Aminosäure die Möglichkeit durch eines der zufälligen Basen-Triplets repräsentiert zu werden, so dass die kombinatorische Möglichkeit der entwickelten Protein-Bibliothek theoretisch bei  $2,56 \times 10^{10}$  unterschiedlichen Proteinen lag.

### 3.1.2 Synthese der Ziel-Peptide

Als Ziel-Peptid sollte eine Sequenz aus dem N-Terminus des CCR5-Rezeptors ausgewählt werden, welche mindestens eines der für den HIV-Zelleintritt verantwortlichen, sulfatierten Tyrosine enthält. Da insbesondere die Sulfatierung von Tyrosin 14 als initialer Schritt für die post-translationale Modifikation der verbleibenden Tyrosine im N-Terminus erforderlich ist [78,87], fiel die Wahl auf den Abschnitt der Aminosäuren 12-18 des CCR5-Rezeptors. Allerdings wurde die sich an Position 18 befindende, saure Aminosäure Glutamat durch Alanin ersetzt, um eine Ladungs-Irritation des *Scaffolds* während des Ribosomen-Displays zu vermeiden.

Zur Verwendung im Ribosomen-Display wurde sowohl die sulfatierte als auch die nicht-sulfatierte Variante des ausgewählten Ziel-Peptids als Säule für die Bindungs-Studien benötigt. Dabei wurde das unmodifizierte Peptid als Negativ-Kontrolle zur Identifikation lediglich Sequenz-spezifischer Binder eingesetzt. Des Weiteren erforderte der abschließende Fluoreszenz-Anisotropie-Assay den Einsatz Fluoreszenzfarbstoff-markierter Peptide, weshalb zusätzlich beide Varianten mit N-terminal gekoppeltem MANT (*N-Methylantranilic acid*) hergestellt wurden. In Tabelle 3.1 sind die zu synthetisierenden Peptid-Varianten des CCR5<sup>12-18</sup> zusammengefasst.

**Tabelle 3.1 Übersicht über die Peptid-Varianten der Sequenz des CCR5<sup>12-18</sup>**

Peptid	Sequenz	MW [g/mol]
<b>sY-Säule</b>	IN <sub>s</sub> YYTSA-(Wang-Resin)	906,04
<b>Y-Säule</b>	INYYTSA-(Wang-Resin)	830,88
<b>sY-Peptid</b>	MANT- IN <sub>s</sub> YYTSA-OH	1038,97
<b>Y-Peptid</b>	MANT- INYYTSA-OH	963,04

Die erforderlichen Peptide wurden nach dem Fmoc-Prinzip mittels basischer Festphasen-Peptid-Synthese hergestellt (Kapitel 2.6.2). Dabei wurde als Festphase ein sogenanntes Wang-Resin (Harz) mit einem vorinstallierten, N-terminal Fmoc-geschützten Alanin verwendet.

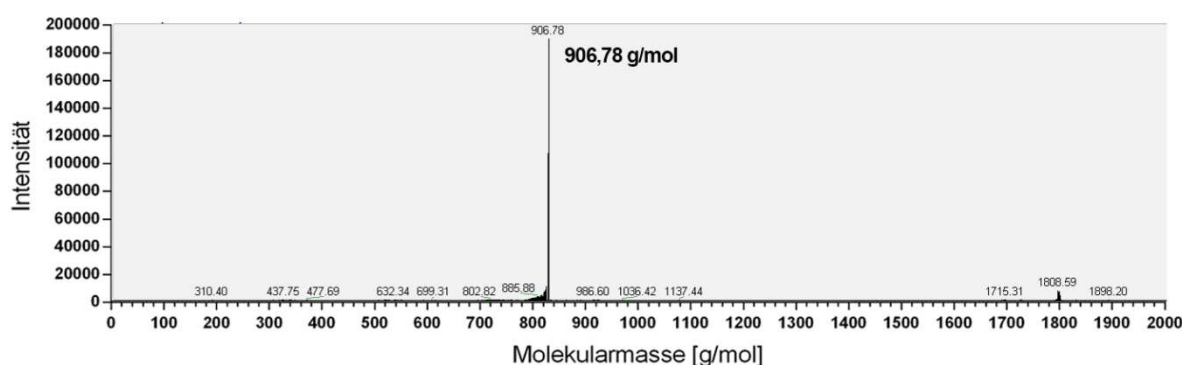
Im Fall der Säulen-Peptide wurden diese nach der Synthese am Harz belassen, da das Wang-Resin gleichzeitig als inertes Trägermaterial für die Bindungs-Studien dienen sollte. So wurde zur Überprüfung der Reinheit des jeweiligen Peptids nur eine Test-Abspaltung für die Massen-

spektrometrische Untersuchung durchgeführt. Dagegen wurden die beiden Peptide für den Fluoreszenz-Anisotropie-Assay nach der MANT-Kopplung vom Harz getrennt und mittels HPLC (*high pressure liquid chromatography*) gereinigt. Die entstandenen Fraktionen wurden ebenfalls Massen-spektrometrisch untersucht und ggf. vereinigt.

### 3.1.2.1 Synthese von IN<sub>S</sub>YYTSA-(Wang-Resin) und INYYTSA-(Wang-Resin)

Zur Herstellung der beiden Säulen-Peptide wurden die entsprechenden Fmoc-Aminosäure-Bausteine, ausgehend von dem vorinstallierten Alanin in C- zu N-terminaler Synthese-Richtung gekoppelt. Dabei musste für jeden Kopplungs-Schritt zunächst die Basen-labile  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe (Fmoc) abgespalten und gleichzeitig die Carboxyl-Gruppe der neu zu koppelnden Aminosäure aktiviert werden. Die Ausbildung der Peptid-Bindung erfolgte anschließend durch Inkubation des entschützten Synthese-Strangs mit einem 5-fachen Überschuss der aktivierten Aminosäure. Nach Kopplung der letzten Aminosäure, wurde eine Test-Abspaltung vorgenommen, um das synthetisierte Peptid mithilfe von LC-MS (*liquid chromatography mass spectrometry*) zu charakterisieren.

Die sulfatierte Variante des Ziel-Peptids wurde unter Verwendung eines Tyrosin-Sulfat-Bausteins mit einer Tetrabutylammonium-Schutzgruppe synthetisiert. Zudem wurden die beiden N-terminal nachfolgenden Aminosäuren Asparagin und Isoleucin jeweils zweimal gekoppelt, um den negativen Effekt der Sulfat-Ladung auf die Kopplungs-Effizienz auszugleichen. Anschließend wurde das Peptid in einem kleinen Anteil des Reaktionsansatzes abgespalten und zur Überprüfung der Reinheit Massen-spektrometrisch untersucht (Abbildung 3.3).

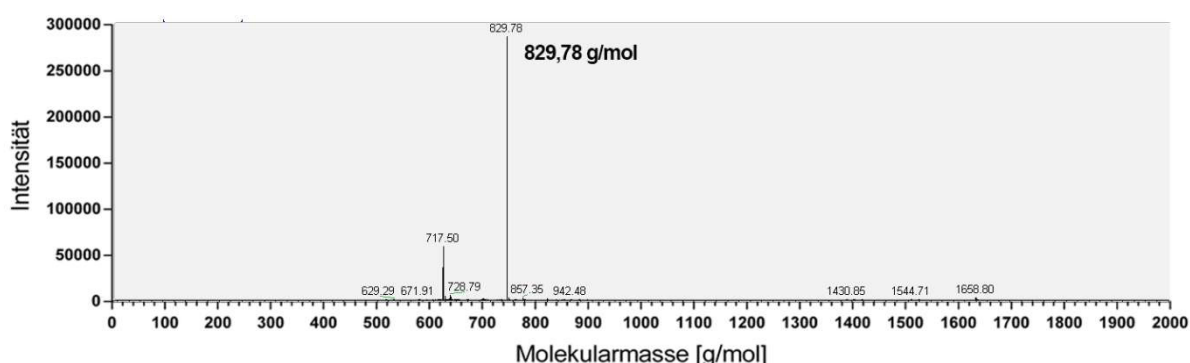


**Abbildung 3.3 Diagramm des Massen-Spektrums von IN<sub>S</sub>YYTSA-OH**

Dargestellt ist das aufgenommene LC-MS-Spektrum des abgespaltenen Peptids von IN<sub>S</sub>YYTSA-(Wang-Resin). Dabei ist die dimensionslose Intensität der Signale gegen die zugehörige Molekularmasse aufgetragen. Das Peptid weist eine Masse von 906,78 g/mol auf.

Die experimentell bestimmte Molekularmasse des <sub>S</sub>Y-Säulen-Peptids im LC-MS-Spektrum beträgt 906,78 g/mol und deckt sich damit mit der theoretischen Masse von IN<sub>S</sub>YYTSA-OH (Tabelle 3.1). Mithilfe der gleichzeitig gemessenen Absorption bei 210 nm konnte zudem durch Integration der Signal-Flächen eine Reinheit von rund 90 % berechnet werden. Dabei gingen nur 5 % der Verunreinigungen auf ein Fehlen der Tyrosin-Sulfatierung zurück. Nach Synthese der sulfatierten Variante des Ziel-Peptids wurde als Negativ-Kontrolle die gleiche Sequenz ohne

Tyrosin-Sulfatierung hergestellt und das Ergebnis ebenfalls durch Test-Abspaltung und Aufnahme eines LC-MS-Spektrums überprüft (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4 Diagramm des Massen-Spektrums von INYYTSA-OH**

Dargestellt ist das aufgenommene LC-MS-Spektrum des abgespaltenen Peptids von INYYTSA-(Wang-Resin). Dabei ist die dimensionslose Intensität der Signale gegen die zugehörige Molekularmasse aufgetragen. Das Peptid weist eine Masse von 829,78 g/mol auf. Zusätzlich ist ein weiteres Signal bei 717,50 g/mol auszumachen.

Die experimentell bestimmte Molekularmasse des Y-Säulen-Peptids im LC-MS-Spektrum beträgt 829,78 g/mol und deckt sich damit mit der theoretischen Masse von INYYTSA-OH (Tabelle 3.1). Das zweite Signal bei 717,50 g/mol würde zu einer Sequenz mit fehlendem Isoleucin passen. Dabei kann das Fehlen dieser Aminosäure auf die nur einmalig durchgeführte Isoleucin-Kopplung während der Synthese zurückgeführt werden. Allerdings zeigt sich bei Integration der entsprechenden Signal-Flächen der Absorption bei 210 nm dennoch eine Peptid-Reinheit von knapp 95 %.

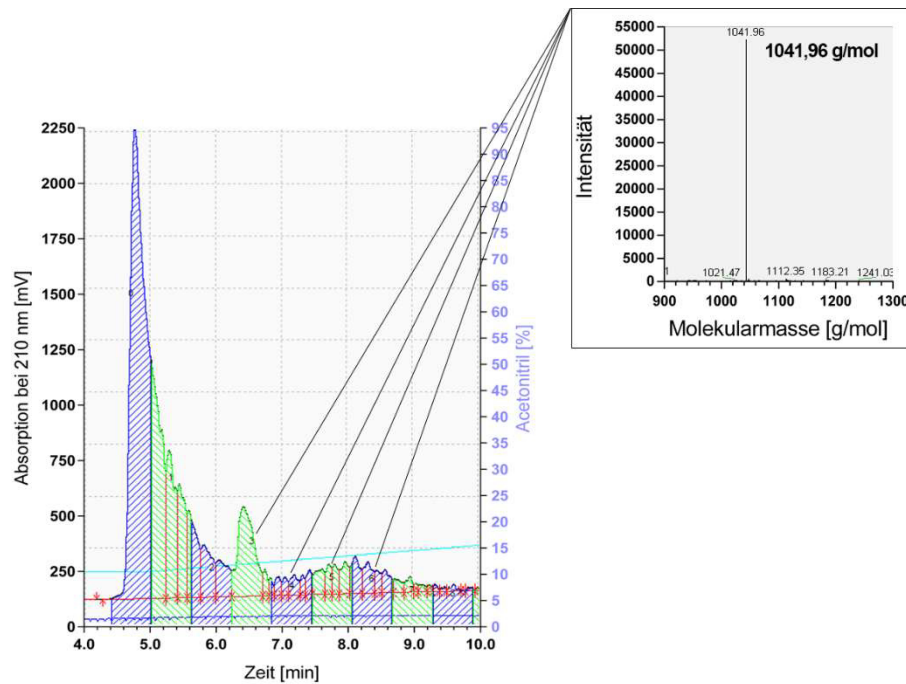
### 3.1.2.2 Synthese und Reinigung von MANT-IN<sub>S</sub>YYTSA-OH und MANT-INYYTSA-OH

Die beiden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Peptide wurden analog zu den Säulen-Peptiden hergestellt. Allerdings wurde im Anschluss an den letzten Synthese-Schritt ein weiterer Baustein in Form des Fluorophors MANT an die N-terminale Aminosäure Isoleucin gekoppelt. Nachfolgend wurden die Peptide vom Harz abgespalten und der Erfolg der Synthese mithilfe von LC-MS-Spektren überprüft (Anhang B).

Um eine größere Reinheit der Peptide für den Fluoreszenz-Anisotropie-Assay zu erzielen, wurde sowohl die sulfatierte als auch die nicht-sulfatierte Variante des MANT-Peptids mithilfe einer HPLC gereinigt. Dafür wurde das konzentrierte Peptid-Gemisch aus dem Synthese-Ansatz auf eine C<sub>18</sub>-Säule gegeben, an welcher die Peptide durch hydrophobe Wechselwirkungen absorbierten. Die Elution wurde durch einen Gradienten unter Verwendung eines Elutions-Systems basierend auf Wasser und Acetonitril eingeleitet. Während des Elutions-Verlaufs wurde das gesamte Eluat in fraktionierter Form aufgefangen, wobei bereits bei etwa 20 % Acetonitril die vollständige Elution aller Bestandteile erfolgt war. Abschließend wurde jede Fraktion Massenspektrometrisch auf das Vorliegen der gewünschten Peptid-Sequenz untersucht und zusammengehörende Fraktionen vereint.

Zunächst wurde die HPLC-Reinigung von MANT-IN<sub>S</sub>YYTSA-OH durchgeführt und ein LC-MS-Spektrum der vereinten Fraktionen aufgenommen (Abbildung 3.).

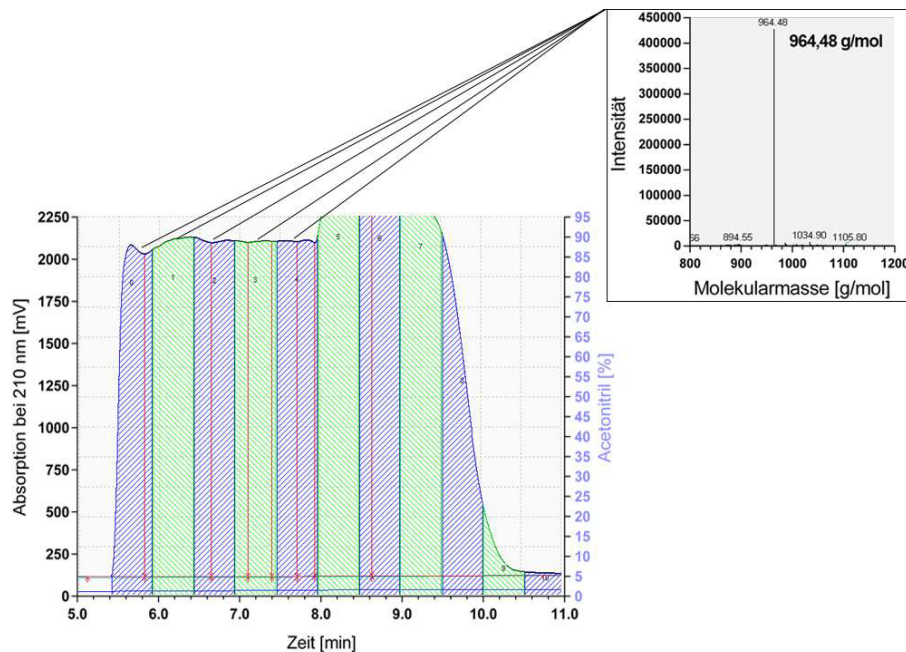




**Abbildung 3.5 HPLC-Chromatogramm und LC-MS-Spektrum von MANT-IN<sub>s</sub>YYTSA-OH**

Das linke Chromatogramm zeigt einen Ausschnitt aus dem Elutions-Verlauf während der HPLC-Reinigung des <sub>s</sub>Y-Peptids. Dabei findet eine Elution des Ziel-Peptids bereits unterhalb von 15 % Acetonitril statt. Durch Vereinigung der Fraktionen 3-6 konnte reines MANT-IN<sub>s</sub>YYTSA-OH gewonnen werden. So weist das Peptid in dem sich auf der rechten Seite befindenden Spektrum eine Masse von 1041,96 g/mol auf.

Die experimentell bestimmte Molekularmasse der Fraktionen 3-6 des HPLC-Chromatogramms beträgt 1041,96 g/mol und deckt sich mit der theoretischen Masse von MANT-IN<sub>s</sub>YYTSA-OH (Tabelle 3.1). So wurde als nächstes die HPLC-Reinigung von MANT-INYYTSA-OH durchgeführt und ein LC-MS-Spektrum der vereinten Fraktionen aufgenommen (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6 HPLC-Chromatogramm und LC-MS-Spektrum von MANT-INYYTSA-OH**

Das linke Chromatogramm zeigt einen Ausschnitt aus dem Elutions-Verlauf während der HPLC-Reinigung des Y-Peptids. Dabei findet eine Elution des Ziel-Peptids bereits bei 0 % Acetonitril statt. Durch Vereinigung der Fraktionen 0-4 konnte reines MANT-INYYTSA-OH gewonnen werden. So weist das Peptid in dem sich auf der rechten Seite befindenden Spektrum eine Masse von 964,48 g/mol auf.



Die experimentell bestimmte Molekularmasse der Fraktionen 0-4 des HPLC-Chromatogramms beträgt 964,48 g/mol und deckt sich damit mit der theoretischen Masse von MANT-INYYTSA-OH (Tabelle 3.1). Die jeweiligen vereinten Fraktionen der sulfatierten und der nicht-sulfatierten Variante des MANT-Peptids wurden lyophilisiert und anschließend in salzfreiem Puffer aufgenommen, um für den Fluoreszenz-Anisotropie-Assay zur Verfügung zu stehen.

## 3.2 Selektion und Identifikation bindender Mutanten

---

Nachdem sowohl die Protein-Bibliothek als auch die Ziel-Peptide entwickelt worden waren, sollte das Ribosomen-Display zur Selektion und Identifikation bindender Mutanten durchgeführt werden. Dafür wurden zunächst Display-fähige Bibliotheks-Konstrukte auf DNA-Ebene durch den Einsatz randomisierter Primer erzeugt. Zudem wurde die Bibliothek durch Klonierung und Transformation des PCR-Produkts auf ihre Diversität überprüft.

Anschließend wurden die generierten DNA-Mutanten *in vitro* exprimiert und durch Stabilisierung des ribosomalen Komplexes eine Verknüpfung der Proteine mit ihrer zugehörigen mRNA erreicht. So konnte nach Selektion der an die jeweilige Peptid-Säule bindenden Mutanten durch Reverse Transkription der RNA und Sequenzierung der resultierenden DNA die Identität potentieller Binder ermittelt werden. Nach Analyse der zugehörigen Protein-Sequenzen wurden dann vielversprechende Mutanten für weitere Experimente ausgewählt.

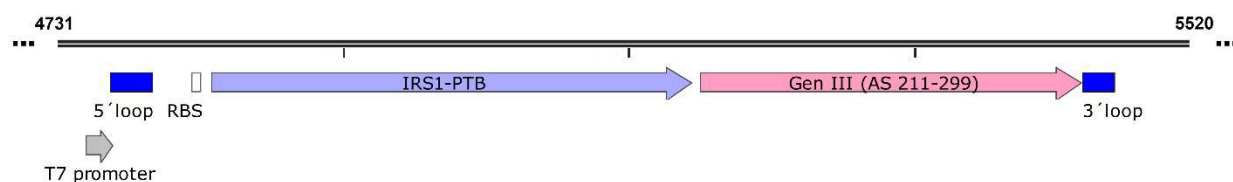
### 3.2.1 Erzeugung Display-fähiger Bibliotheks-Konstrukte

Die DNA-Konstrukte für den Einsatz in einem Ribosomen-Display müssen bestimmte Anforderungen erfüllen. So benötigen sie beispielsweise einen Promoter sowie ein Translations-Initiations-Signal [210]. Außerdem muss sichergestellt werden, dass sich das *Scaffold*-Protein komplett in seine aktive Konformation falten kann. Daher wird auf DNA-Ebene eine C-terminale *Linker*-Domäne angefügt, welche es dem resultierenden Protein ermöglicht, den ribosomalen Tunnel in gesamter Länge zu verlassen [211]. Zur Extraktion dieser Fusions-DNA muss diese zuletzt mithilfe randomisierter Primer amplifizierbar sein und die erwartete Vielfalt an Mutationen aufweisen.

#### 3.2.1.1 Amplifikation des DNA-Konstrukts

Das DNA-Konstrukt zur späteren Erzeugung der Protein-Bibliothek auf Basis der IRS1-PTB-Domäne wurde von der Firma *Sina Science Services* in einen pET41a(+)-Vektor kloniert. Dieser enthielt bereits einen T7-Promotor und wurde daher nur noch um die Ribosomen-Bindungsstelle sowie eine 5'- und 3'-*Loop*-Region erweitert. Zwischen diese *Loop*-Regionen wurde die Fusions-DNA kloniert, wobei der Abschnitt für die IRS1-PTB-Domäne noch keine Mutationen enthielt und daher für die native Aminosäure-Sequenz codierte. Der C-terminale Linker wurde durch die codierende Sequenz für die Aminosäuren 211-299 des M13-Bakteriophagen-Gens III

repräsentiert. Für die Verwendung im Ribosomen-Display wurde zudem das im Anschluss an die 3'-Loop-Region in der Sequenz enthaltene Stopp-Codon deletiert (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5 Gen-Abschnitt des für die Protein-Bibliothek codierenden pET41a(+)-Vektors**

Der für die Protein-Bibliothek codierende Gen-Abschnitt des Vektors befindet sich im Bereich der Basenpaare 4731-5520. Im Anschluss an den T7-Promotor (grau) folgt eine 5'-Loop-Region (blau), die zusammen mit der 3'-Loop-Region (blau) die Fusions-DNA aus IRS1-PTB (violett) und Gen III (pink) einrahmt. Die Ribosomen-Bindungsstelle (weiß) befindet sich in 5'-Richtung zur codierenden Sequenz der IRS1-PTB-Domäne.

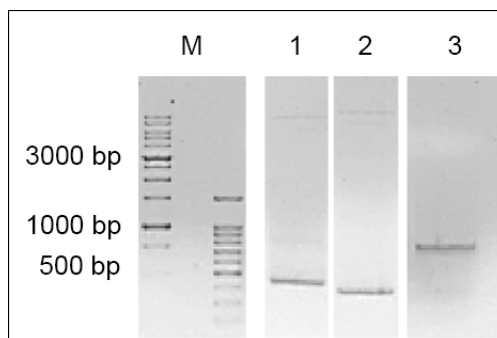
Nach Klonierung des DNA-Konstruktes sollte dieses mithilfe eines oder mehrerer randomisierter Primer amplifiziert werden. Dabei konnte jedoch aufgrund der speziellen Lage der während des Bibliotheks-Designs ausgewählten Basen-Triplets die Amplifikation nicht in einem Schritt vollzogen werden. Daher wurden zunächst die IRS1-PTB sowie Gen III in zwei getrennten PCRs unter Aufteilung der erforderlichen Mutations-Positionen extrahiert. Tabelle 3.102 zeigt eine Übersicht der dafür verwendeten Primer.

**Tabelle 3.2 Übersicht der für die Erzeugung der Bibliothek verwendeten Primer**

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge	Bindungs-Stelle
IRS1_for	gcgaaattaatacgaactcactataggg	27-mer	4744...4770
IRS1_rev	cccgggccccgtcacggcMNNMNNMNNcacctcgatg aagaagaagtttccgagtggccacagcgMNNgatgttMN Ncagctgcagcaccacgg	30-mer	4842...4859
GenIII_for	cacgagaccatcctggaggccNNKNNKgcatgNNKg atgagttccgccctcgcg	55-mer	5121...5175
GenIII_rev	tctctcctcgagggtcaccttcacgggtgggccctgtagcgcg tttcatcggcattttc	61-mer	5421...5475

Die erforderlichen NNK-Codons für die Erzeugung der entsprechenden Mutationen befanden sich zum einen im *Reverse*-Primer der IRS1-PTB und zum anderen im *Forward*-Primer des Gens III. Dabei entsprechen die MNN-Codons dem reversen Komplement der NNK-Codons. So wurde die Mutation der codierenden Basen-Triplets für die Aminosäuren an Position X<sub>1</sub> bis X<sub>5</sub> durch den Primer IRS1\_rev erzeugt, während die Basen-Mutationen für die Aminosäuren an den Positionen X<sub>6</sub> bis X<sub>8</sub> durch den Primer GenIII\_for zustande kamen.

Nach Erzeugung der beiden PCR-Fragmente wurden diese mithilfe eines Agarose-Gels gereinigt und in einer weiteren PCR als Primer eingesetzt. Dabei wurde als *Template* erneut das klonierte DNA-Konstrukt verwendet und so eine Fusion der beiden Fragmente ermöglicht. Somit konnte in zwei Schritten der mit einer Größe von 739 bp gewünschte DNA-Abschnitt für das Ribosomen-Display generiert werden (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6 Amplifikation des DNA-Konstrukts**

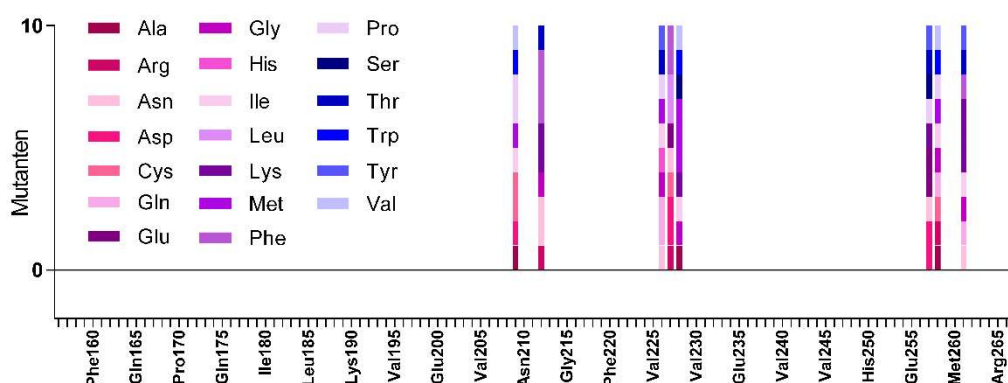
Dargestellt sind die DNA-Fragmente der PCRs zur Amplifikation von IRS1-PTB (1) und Gen III (2) sowie der Fusions-PCR (3). Die Fragment-Größen entsprechen 362 bp, 333 bp und 739 bp.

Das resultierende Fragment der Fusions-PCR enthielt nun die gesamte Sequenz für die *in vitro* Expression und beinhaltete alle erforderlichen Codon-Mutationen für die Erzeugung der Protein-Bibliothek.

### 3.2.1.2 Überprüfung der Bibliotheks-Diversität

Bevor das generierte DNA-Fragment im Ribosomen-Display eingesetzt wurde, sollte zunächst die Mutations-Vielfalt überprüft werden. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Protein-Bibliothek die erwartete Diversität besaß und die Bindungs-Studien nicht aufgrund einer bevorzugten Mutante verfälscht wurden.

Daher wurde ein Pool von Fragmenten aus der Fusions-PCR in aktivierte *TOPO*-Vektoren kloniert (Kapitel 2.2.4) und durch die Firma *GATC* sequenziert. Durch Translation der analysierten DNA-Sequenz zeigte sich, dass bereits aus einer Stichprobe von 10 Klonen eine Vielzahl unterschiedlicher Mutanten hervor ging (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7 Mutationen bei der Überprüfung der Bibliotheks-Diversität**

Dargestellt sind die Mutationen der 10 analysierten Klone, aufgetragen gegen ihre Position in der Aminosäure-Sequenz der IRS1-PTB-Domäne.

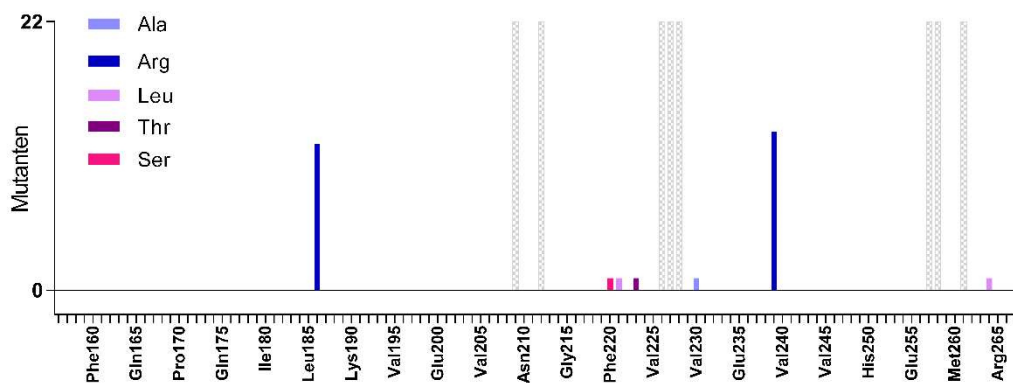
Die Analyse der 10 Mutanten zeigte ein Vorliegen der Mutationen an den ausgewählten Positionen  $X_1 - X_8$ . Zudem wurde jede Mutations-Position durch mindestens 7 unterschiedliche Aminosäuren besetzt, wobei gleichzeitig alle 20 proteinogenen Aminosäuren in den jeweils

8 Mutations-Positionen der 10 Sequenzen vertreten waren. Daher konnte davon auszugehen werden, dass die entwickelte Protein-Bibliothek die erforderliche Diversität für ihren Einsatz im Ribosomen-Display mit sich brachte.

### 3.2.2 Auswahl bindender Mutanten

Zur Auswahl potentieller Binder für CCR5<sup>12-18</sup> wurde auf Basis der Protein-Bibliothek ein Ribosomen-Display (Kapitel 2.4.5) durchgeführt, mit welchem die enthaltenen Mutanten nach ihrem Phänotyp selektiert und anhand ihres Genotyps identifiziert werden konnten. Dabei kamen die sulfatierte und die nicht-sulfatierte Variante der Säulen-Peptide als stationäre Phase und die bei der *in vitro*-Expression erzeugten ribosomalen Komplexe als mobile Phase zum Einsatz. Dementsprechend konnten die Mutanten anhand ihrer Bindungs-Affinität für die entsprechende Peptid-Säule selektiert werden. Durch anschließende Reverse Transkription der zugehörigen RNA sowie Sequenzierung der gewonnenen DNA konnte dann auf die bindenden Proteine rückgeschlossen werden.

Um die Qualität der selektierten Binder zu verbessern, wurde die gewonnene DNA insgesamt zweimal in einem weiteren Selektions-Zyklus eingesetzt. Dadurch konnte die Identifikation unspezifisch bindender Proteine vermieden und ein relativ eindeutiges Bild der bindenden Mutanten erzeugt werden. So wurden nach dem letzten Zyklus jeweils 11 Klone aus den Ribosomen-Displays der <sub>s</sub>Y- sowie der Y-Säule durch die Firma GATC sequenziert und anschließend in die entsprechende Aminosäure-Sequenz übersetzt (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8 Mutationen der selektierten Binder**

Dargestellt sind Mutationen der 22 analysierten Klone, aufgetragen gegen ihre Position in der Aminosäure-Sequenz der IRS1-PTB-Domäne. Dabei zeigen die grauen Balken die jeweilige Sequenz-Position der ausgewählten Mutations-Stellen. Die tatsächlichen Mutationen der identifizierten Binder sind entsprechend der detektierten Aminosäure farbig gekennzeichnet. Zudem entspricht die Höhe des Balkens der Auftritts-Häufigkeit.

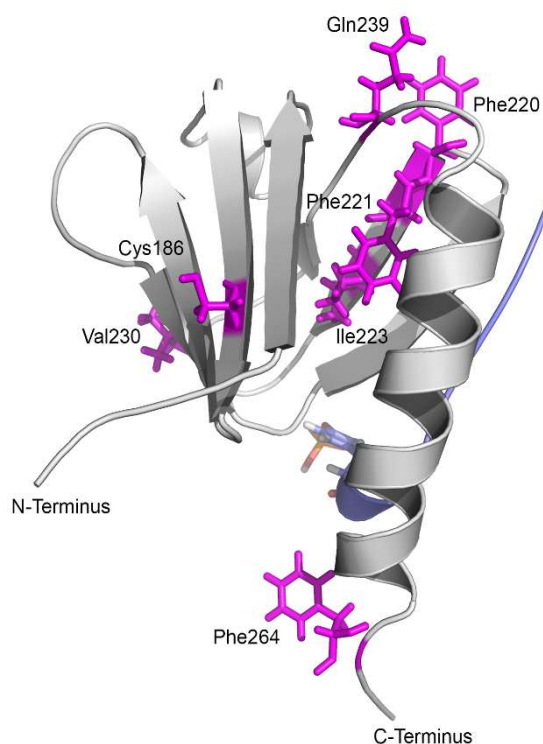
Interessanterweise besaß keine der identifizierten Mutanten eine Mutation an den ausgewählten Positionen X<sub>1</sub> - X<sub>8</sub>. Stattdessen beinhalteten die selektierten Binder Mutationen an den Sequenz-Positionen von Cystein 186, Phenylalanin 220, Phenylalanin 221, Isoleucin 223, Valin 230, Glutamin 239 und Phenylalanin 264. Zudem befand sich unter den insgesamt 22 sequenzierten Klonen insgesamt sechsmal die *Wildtyp*-IRS1-PTB-Domäne.

Tabelle 3.3 zeigt die einzelnen Mutanten und die Häufigkeit ihres Auftretens im Überblick.

**Tabelle 3.3 Zusammenstellung der selektierten Mutanten**

Mutation	Häufigkeit <sub>gesamt</sub>	Häufigkeit <sub>sY-Säule</sub>	Häufigkeit <sub>Y-Säule</sub>
<i>Wildtyp</i>	6	5	1
Cys186Arg/Gln239Arg	12	2	10
Phe221Leu/Gln239Arg	1	1	0
Ile223Thr/Val230Ala	1	1	0
Phe220Ser	1	1	0
Phe264Leu	1	1	0

Während bei den selektierten Mutanten des sulfatierten Ziel-Peptids am häufigsten der *Wildtyp* erschien, dominierte unter den Bindern der nicht-sulfatierten Variante eine Cys186Arg/Gln239Arg-Mutante. Daher konnte diese zunächst als einzige für den Fluoreszenz-Anisotropie-Assay ausgewählt werden und wurde dementsprechend als Mutante-1 bezeichnet. Um die Auswahl weiterer Mutanten zur Untersuchung der Bindungs-Affinität zu erleichtern, wurden die Mutationen auf die Sequenz der IRS1-PTB-Domäne übertragen (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9 Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit den Mutationen der selektierten Binder**

Die detektierten Mutationen befinden sich in Faltblatt 2 (Cys186), in Faltblatt 6 (Phe220, Phe221, Ile223), im *Loop* zwischen Faltblatt 6 und 7 (Val230), im *Loop* zur Helix (Gln239) und in der Helix selbst (Phe264).

Dabei konnten insbesondere im sechsten Faltblatt mehrere mutierte Aminosäuren ausgemacht werden, welche sich zudem in räumlicher Nähe zur Gln239Arg-Mutation befanden. So wurden

Mutante-2 und Mutante-3 durch Ergänzung von Mutante-1 gewonnen, wobei zunächst nur die Phe221Leu-Mutation und dann die Phe220Ser- sowie Ile223Thr-Mutation eingefügt wurden (Abbildung 3.10).

```

IRS1-PTB (WT)      156 MGPAPKEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLCLTSKTISFVKLNSEAAAVV
                    LQLMNIRRCGHSENF267FFIEVGRSAVTGPGEFWMQVDDSVVAQNMHETILE
                    AMRAMSDEFPR267

IRS1-PTB (Mut1)    156 MGPAPKEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLRLTSKTISFVKLNSEAAAVV
                    LQLMNIRRCGHSENF267FFIEVGRSAVTGPGEFWMRVDDSVVAQNMHETILE
                    AMRAMSDEFPR267

IRS1-PTB (Mut2)    156 MGPAPKEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLRLTSKTISFVKLNSEAAAVV
                    LQLMNIRRCGHSENF267LFIEVGRSAVTGPGEFWMRVDDSVVAQNMHETILE
                    AMRAMSDEFPR267

IRS1-PTB (Mut3)    156 MGPAPKEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLRLTSKTISFVKLNSEAAAVV
                    LQLMNIRRCGHSENF267SLFTEVGRSAVTGPGEFWMRVDDSVVAQNMHETILE
                    AMRAMSDEFPR267
    
```

**Abbildung 3.10 Sequenzen der ausgewählten Mutanten**

Alle Mutanten beinhalten eine Cys186Arg/Gln239Arg-Mutation. Dabei wird Mutante-2 durch eine Phe221Leu-Mutation ergänzt. Mutante-3 wurde durch Hinzunahme einer Phe220Ser- sowie Ile223Thr-Mutation generiert.

Folglich handelt es sich bei Mutante-1 und -2 um tatsächlich selektierte Binder, wobei erstere die nicht-sulfatierte und letztere die sulfatierte Peptid-Variante bevorzugen sollte. Dagegen wurde Mutante-3 durch Kombination mehrerer Mutanten generiert und besitzt somit noch keine erkennbare Bindungs-Präferenz.

### 3.3 Expression und Untersuchung ausgewählter Mutanten

Nach Auswahl der drei Mutanten, sollten diese gemeinsam mit dem *Wildtyp* exprimiert und gereinigt sowie die Bindungs-Affinitäten gegenüber dem Ziel-Peptid bestimmt werden.

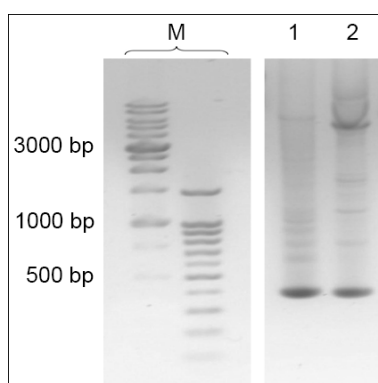
Die entsprechenden Expressions-Konstrukte entstanden durch Klonierung oder zielgerichtete Mutagenese. Nach Expression im *E. coli*- Stamm BL21 wurde das jeweilige GST-*tag*-Mutanten-Fusionsprotein analog zum *Wildtyp* in zwei Etappen, bestehend aus Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie, gereinigt. Anschließend wurde ein Fluoreszenz-Anisotropie-Assay zur Untersuchung der Bindungs-Affinität der Proteine zur sulfatierten und nicht-sulfatierten Variante des MANT-markierten Zielpeptids durchgeführt.

#### 3.3.1 Erstellung von Expressions-Konstrukten der Mutanten

Um den *Wildtyp* sowie die drei Mutanten rekombinant in *E. coli* exprimieren zu können, wurden die IRS1-PTB und Mutante-1 in einen Expressionsvektor mit T7-Promotor kloniert. Anschließend wurden die erforderlichen Aminosäure-Veränderungen für Mutante-2 und -3 am codierenden Plasmid von Mutante-1 vorgenommen.

Das für die IRS1-PTB beziehungsweise Mutante-1 codierende Gen wurde aus dem zugehörigen *TOPO*-Vektor mittels PCR amplifiziert und mit einer *Bam*HI- sowie *Xho*I-Restriktionsschnittstelle

versehen. Das resultierende Produkt (361 bp) wurde mithilfe eines Agarose-Gels identifiziert und gereinigt (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11 Amplifikation der IRS1-PTB und Mutante-1**

Die PCR-Produkte der IRS1-PTB (1) und Mutante-1 (2) weisen unter Berücksichtigung der angehängten *Bam*HI- und *Xho*I-Schnittstelle eine Größe von 361 bp auf. Als Größenmarker (M) wurden der mi-1kp und der mi-100bp eingesetzt.

Anschließend wurde das für die IRS1-PTB beziehungsweise Mutante-1 codierende Gen in einen pET41b\_*PreScission*-Vektor mit N-terminalem GST-tag kloniert.

Das für Mutante-2 beziehungsweise Mutante-3 codierende Gen wurde durch zielgerichtete Mutagenese auf dem klonierten Expressions-Konstrukt von Mutante-1 generiert. Dabei wurde jeweils ein Primer-Paar eingesetzt, das die entsprechenden auszutauschenden Basen enthielt. In Tabelle 3.4 sind die zugehörigen Primer aufgelistet, wobei sich die jeweilige Bindungs-Stelle auf die Basenpaar-Position im Plasmid bezieht.

**Tabelle 3.4 Sequenzen der Mutagenese-Primer für Mutante-2 und Mutante-3**

Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge	Bindungs-Stelle
<b>Mut-2_for</b>	GGCCA <b>CT</b> CGGAA <b>AACTTCC</b> TCTTCATCGAGGTGGGC	36-mer	489...524
<b>Mut-2_rev</b>	GCCCA <b>CT</b> CGATGAAG <b>AGGAAGTTT</b> CCGAGTGGCC	36-mer	489...524
<b>Mut-3_for</b>	GGCCA <b>CT</b> CGGAA <b>AACTCC</b> TCTTCACCGAGGTGGGCCGT	39-mer	486...524
<b>Mut-3_rev</b>	ACGGCC <b>CA</b> CCTCG <b>GT</b> GAA <b>AGGG</b> AGTTTCCGAGTGGCC	39-mer	486...524

Nach erfolgreicher Mutagenese lagen sowohl Wildtyp als auch die drei Mutanten als GST-Fusionskonstrukte vor. Das bei der Expression entstehende Fusionsprotein hat den Vorteil, dass es mit hoher Affinität an Glutathion-Sepharose-Säulenmaterial bindet und nachfolgend mithilfe der *PreScission*-Protease spezifisch geschnitten werden kann, wodurch Ziel-Proteine mit nativer Aminosäure-Sequenz entstehen.

Die erstellten Klone wurden durch die Firma GATC sequenziert. Je ein korrekter Klon wurde dann in Form von gereinigter Plasmid-DNA und als bei -80 °C in Glycerin gelagerte *E. coli*-Kultur konserviert.



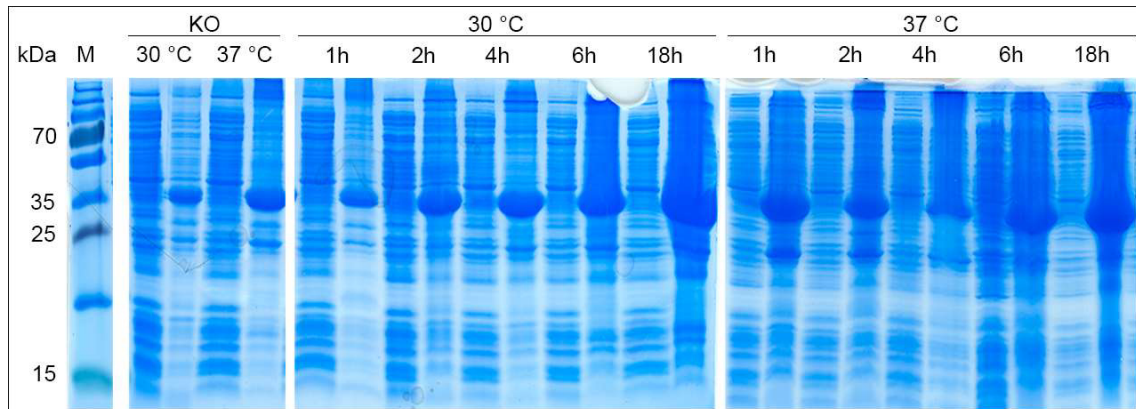
### 3.3.2 Expression und Reinigung der Mutanten

Nach der erfolgreichen Erstellung von *Wildtyp*- und Mutanten-codierenden Plasmiden, sollten die GST-*tag*-Fusionsproteine exprimiert und mithilfe einer Affinitäts- sowie Größenausschluss-Chromatographie gereinigt werden.

#### 3.3.2.1 Optimierung der Expressions-Bedingungen für das GST-IRS1-PTB-Konstrukt

Um die optimalen Expressionsbedingungen für das *Wildtyp*-Konstrukt GST-*tag*-IRS1-PTB festlegen zu können, wurde zunächst ein Expressionstest unter Variation der Expressionsdauer sowie der Temperatur durchgeführt.

Als Expressionssystem wurde der *E. coli*-Stamm BL21 eingesetzt. Die Probennahme erfolgte nach 1, 2, 4, 6 und 18 Stunden bei einer Expressionstemperatur von 37 °C und 30 °C. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe ohne die Induktion der Expression durch 0,5 mM IPTG kultiviert. Nach Aufschluss der Zellen wurden Überstände und Pellets in einer SDS-PAGE (Kapitel 2.4.1) analysiert (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12 Proteinnachweis nach dem Expressionstest von GST-*tag*-IRS1-PTB**

Zum Nachweis des in *E. coli* BL21 exprimierten Proteins wurden Überstände (Ü) und Pellet-Fractionen (P) abwechselnd auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Größenmarker (M) diente der PR+p. KO beschreibt die jeweiligen Proben ohne IPTG-Induktion. Sowohl die Expression bei 30 °C als auch die bei 37 °C zeigt für alle Zeitpunkte eine deutliche Proteinbande bei etwa 40 kDa. Im Vergleich von Überstand und Pellet befindet sich der wesentliche Anteil des exprimierten GST-*tag*-IRS1-PTB in der löslichen Fraktion.

Der Expressionstest zeigt eine starke Expression des 40,4 kDa-großen GST-*tag*-IRS1-PTB-Konstrukts bei 30 °C sowie bei 37 °C. Dabei findet interessanterweise eine Expression bei beiden Temperaturen auch ohne IPTG-Induktion statt. Im Vergleich scheint allerdings die höhere Temperatur die zusätzliche Expression unerwünschter Proteine zu begünstigen, während bei 30 °C mit zunehmender Zeit eine stetige Zunahme der gewünschten Protein-Expression zu beobachten ist. Daher wurden als optimale Expressionsbedingungen eine Temperatur von 30 °C und eine Expressionsdauer von 18 Stunden ausgewählt.

Nach Optimierung der Expression des *Wildtyps*, wurde unter Verwendung der gleichen Bedingungen auch die Expression der drei Mutanten untersucht. Dabei zeigte sich, dass das entwickelte Protokoll sowohl für die IRS1-PTB-Domäne als auch für Mutante-1 bis -3 angewendet werden kann.

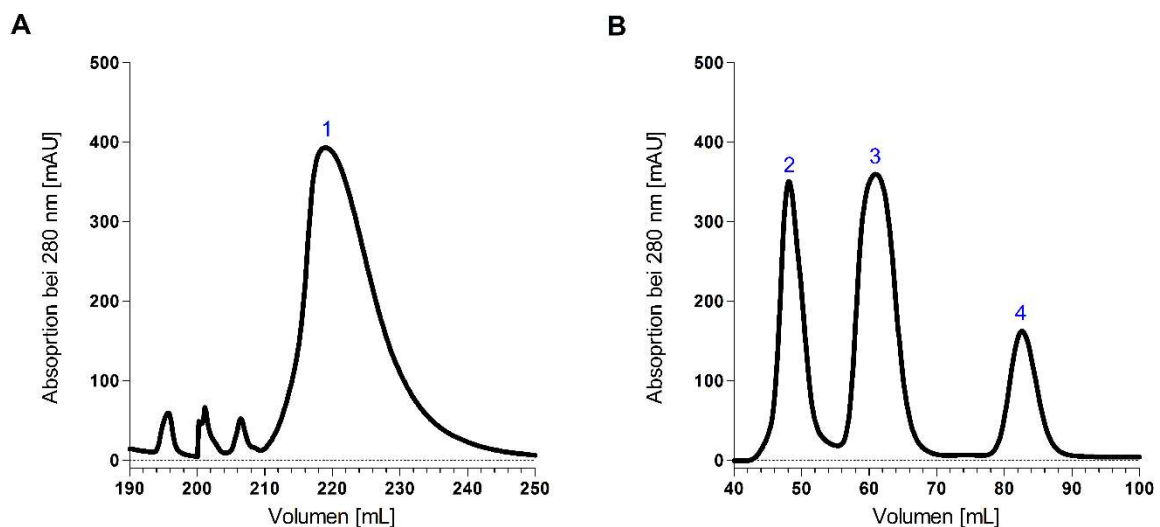


### 3.3.2.2 Etablierung der Reinigung der IRS1-PTB-Domäne

Für den Einsatz des *Wildtyps* und der identifizierten Mutanten im Fluoreszenz-Anisotropie-Assay wurde rekombinantes Protein in sehr reiner Form benötigt. Daher musste das bei der Expression generierte Fusionsprotein mithilfe des GST-tags in einer Affinitäts-Chromatographie gereinigt und die IRS1-PTB vom GST-Protein mittels SEC (*size exclusion chromatography*) getrennt werden (Kapitel 2.4.3).

Dazu wurden zunächst die Bakterienpellets der Expression durch Ultraschall aufgeschlossen (Kapitel 2.4.2). Das erhaltene Gemisch aus löslichen Proteinen wurde für die Affinitäts-Chromatographie verwendet. Dabei wurde das Proteingemisch auf eine Glutathion-Sepharose-Säule gegeben und die Elution mithilfe des Glutathion-haltigen GST-Elutionspuffers eingeleitet. Während der Elutionsschritte wurde das gesamte Eluat in fraktionierter Form aufgefangen. Die Fusionsprotein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend unter Anwesenheit der *PreScission*-Protease inkubiert. Nach Spaltung des GST-tag-IRS1-PTB-Fusionsproteins wurden die einzelnen Bestandteile mittels SEC getrennt. Dafür wurde das konzentrierte Gemisch aus GST- und IRS1-PTB-Protein auf die mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Säule gegeben. Die Elution wurde fraktioniert gesammelt und unter einem Signal erscheinende Fraktionen vereint sowie konzentriert.

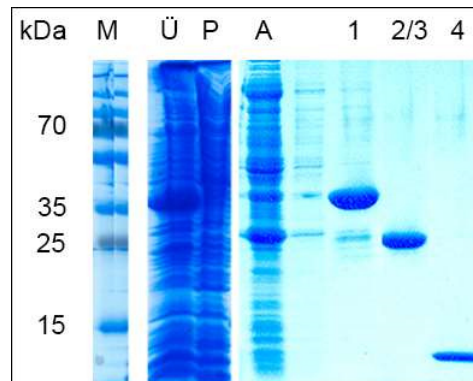
Das Chromatogramm der Affinitäts-Chromatographie zeigt kurz nach Beginn der Elution drei kleinere Signale, die vermutlich auf nur schwach an der Glutathion-Sepharose-Matrix bindende endogene Proteine zurückzuführen sind. Das nächste Signal ist schärfer und deutlich höher und beinhaltet vermutlich die Elution von GST-tag-IRS1-PTB (Abbildung 3.13 A). Der Verlauf der anschließenden SEC des geschnittenen Fusionsproteins zeigt dagegen während der Elution statt der zu erwartenden zwei insgesamt drei Maxima. Das gesuchte Zielprotein IRS1-PTB sollte aber aufgrund seiner kleineren Molekülgröße im letzten Signal zu finden sein (Abbildung 3.13 B).



**Abbildung 3.13 Verlauf der Reinigung der rekombinanten IRS1-PTB-Domäne**

**A** zeigt den Verlauf der Elutionsschritte der Affinitäts-Chromatographie von GST-tag-IRS1-PTB. Das Signalmaximum der Proteindetektion des Fusions-Proteins bei 280 nm erscheint erst im späteren Elutionsverlauf (1). **B** stellt den Verlauf der SEC zur Trennung des GST-Proteins von der IRS1-PTB dar. Dabei können während der Elution drei Signale bei 280 nm detektiert werden (2-4).

Um die einzelnen Schritte der Reinigung der IRS1-PTB-Domäne nachvollziehen zu können, wurden während den einzelnen Etappen SDS-Proben erstellt und eine SDS-PAGE durchgeführt. Die generierten Proben umfassten Überstand und Pellet, den Auftrag und das Signalmaximum der Affinitäts-Chromatographie sowie die drei Signalmaxima der SEC. Dabei zeigt sich anhand des SDS-Gels, dass GST-*tag*-IRS1-PTB erfolgreich gereinigt, gespalten und so die reine IRS1-PTB gewonnen werden kann (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14 Nachweis der Etappen der Reinigung der IRS1-PTB-Domäne**

Das SDS-Gel stellt den Proteinnachweis zu den einzelnen Reinigungsschritten dar. Als Größenmarker (M) wurde der PR+p verwendet. Die Expression des Fusionsproteins zeigt sich sowohl im Überstand (Ü) als auch im Pellet (P) bei etwa 40 kDa. Die Geldaschen sind entsprechend der Chromatogramme nummeriert.

Der Proteinnachweis der Reinigung der IRS1-PTB-Domäne zeigt zunächst die erfolgreiche Expression des GST-IRS1-PTB-Fusionsproteins bei 40,4 kDa. Das Haupt-Signal der anschließenden Affinitäts-Chromatographie enthält tatsächlich das reine GST-*tag*-IRS1-PTB. Der Schnitt des konzentrierten Fusionsproteins wird durch die Auftrennung der jeweils zusammengehörigen Signale der SEC mit der Größenaufspaltung zu 27,8 kDa und 12,6 kDa sichtbar. Dabei zeigt sich auch, dass das GST-IRS1-PTB-Fusionsprotein bereits in großer Reinheit vorliegt.

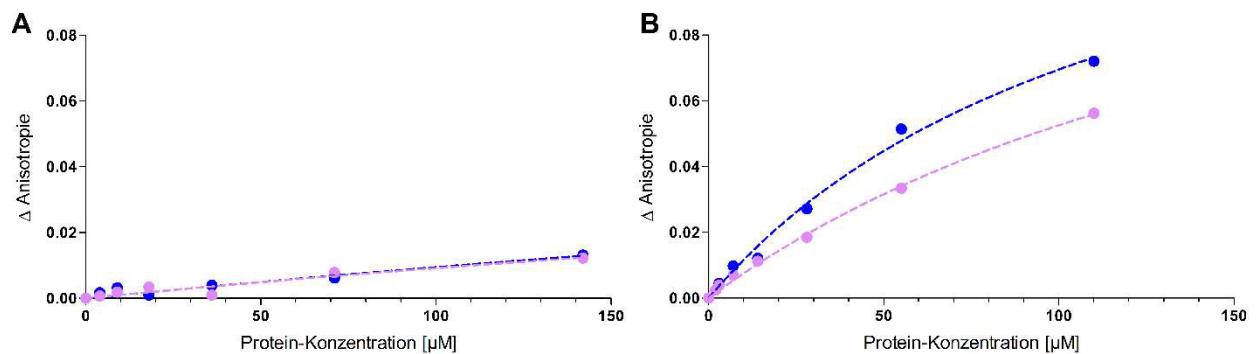
Mutante-1, -2 und -3 ließen sich analog zur IRS1-PTB-Domäne reinigen. Allerdings fiel ihre Ausbeute vor dem Schneiden durch die *PreScission*-Protease deutlich zufriedenstellender aus als nach der SEC. Daher wurde die große Reinheit des GST-*tag*-Mutanten-Fusionsproteins in Anspruch genommen und der Fluoreszenz-Anisotropie-Assay dementsprechend ausschließlich mit GST-*tag*-Proteinen durchgeführt.

### 3.3.3 Untersuchung der Bindungs-Affinität von Mutanten und Ziel-Peptid

Zur Ermittlung der Affinität von *Wildtyp* und Mutante-1 bis -3 zur sulfatierten und nicht-sulfatierten Variante des Ziel-Peptids sollte die Bindung mithilfe eines Fluoreszenz-Anisotropie-Assays untersucht werden. Dieser basiert auf dem Zusammenhang zwischen der Rotations-Korrelationszeit und dem Molekulargewicht eines Moleküls, wobei sich Veränderungen des

Molekulargewichts in veränderten Rotations-Korrelationszeiten widerspiegeln. Bei Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteinen äußert sich diese Veränderung in einer Zu- oder Abnahme der Anisotropie. So sollte die Bindung der zu untersuchenden Mutante an eines der MANT-markierten Ziel-Peptide aufgrund der Zunahme des Molekulargewichts mit einem Anstieg der Anisotropie verbunden sein.

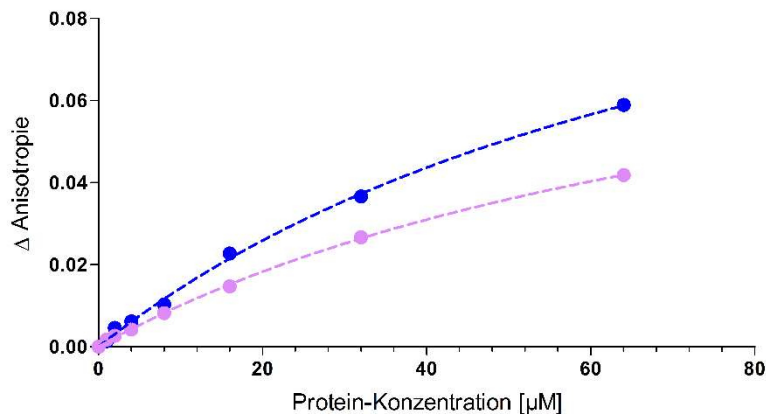
Im durchgeführten Fluoreszenz-Anisotropie-Assay wurde die Konzentration des jeweiligen MANT-markierten Peptids konstant gehalten und zunehmende Konzentrationen des zu untersuchenden GST-Proteins hinzugegeben. Dabei wurde durch gesonderte Untersuchung des GST-tags sichergestellt, dass eine eventuelle Bindung auf das entsprechende, anhängende Protein zurückzuführen ist. Somit wurde zunächst die Bindungs-Affinität von GST und der GST-IRS1-PTB-Domäne zum Vergleich untersucht (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15 Diagramme der Anisotropie-Messung von GST und der IRS1-PTB-Domäne**

Die Anisotropie-Werte wurden gegen die jeweilige Protein-Konzentration aufgetragen und mithilfe von Formel 2.3 gefittet. Dabei sind die Kurven des sY-Peptids (pink) und des Y-Peptids (blau) jeweils in einem Diagramm dargestellt. Während die zu GST (A) gehörigen Kurven einen schwachen linearen Anstieg zeigen, enthält das Diagramm der GST-IRS1-PTB-Domäne (B) für beide Peptid-Varianten eine deutliche Bindungs-Kurve.

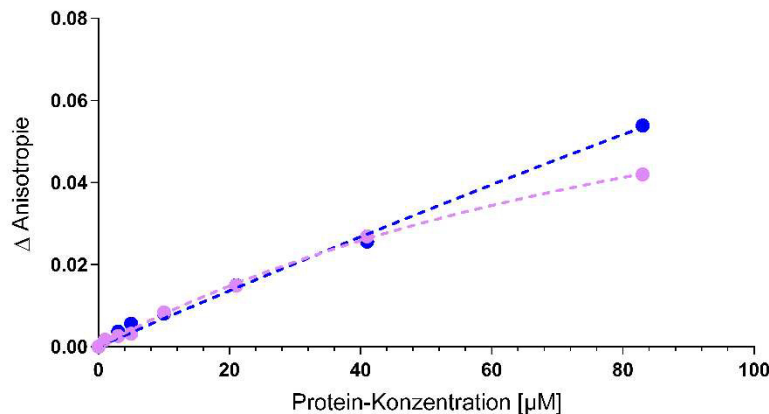
Für die GST-IRS1-PTB-Domäne ist sowohl für die sulfatierte als auch für die nicht-sulfatierte Variante des Ziel-Peptids eine Bindungs-Kurve zu erkennen. Dagegen zeigen die Messungen mit GST in beiden Fällen keine Bindung, weshalb das Vorliegen des GST-tags für alle weiteren Messungen ignoriert werden kann. Nachdem bereits der *Wildtyp* eine Bindungs-Affinität zum Ziel-Peptid gezeigt hatte, wurde als nächstes Mutante-1 untersucht (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16 Diagramm der Anisotropie-Messung von Mutante-1**

Die Anisotropie-Werte des sY-Peptids (pink) und des Y-Peptids (blau) sind gegen die Protein-Konzentration von Mutante-1 aufgetragen und mit Formel 2.3 gefittet.

Auch Mutante-1 wies in Anwesenheit beider Peptid-Varianten eine deutliche Bindungs-Kurve auf, wohingegen sich bei der Untersuchung von Mutante-2 ein anderes Bild ergab (Abbildung 3.17).

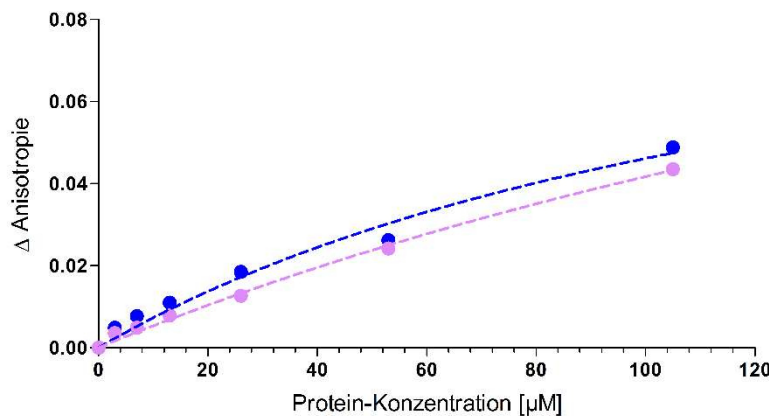


**Abbildung 3.17 Diagramm der Anisotropie-Messung von Mutante-2**

Die Anisotropie-Werte des sY-Peptids (pink) und des Y-Peptids (blau) sind gegen die Protein-Konzentration von Mutante-2 aufgetragen und mit Formel 2.3 gefittet.

Während zwischen Mutante-2 und dem sulfatierten Ziel-Peptid offensichtlich eine Bindungs-Affinität vorlag, zeigte die Anisotropie-Messung mit der nicht-sulfatierten Peptid-Variante einen nahezu linearen Anstieg. Dementsprechend scheint das sY-Peptid von Mutante-2 bevorzugt zu werden.

Abschließend wurde die Bindungs-Affinität von Mutante-3 zu den beiden Varianten des Ziel-Peptids untersucht (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18 Diagramm der Anisotropie-Messung von Mutante-3**

Die Anisotropie-Werte des sY-Peptids (pink) und des Y-Peptids (blau) sind gegen die Protein-Konzentration von Mutante-3 aufgetragen und mit Formel 2.3 gefittet.

Dabei zeigte diese letzte Mutante sowohl eine Bindung zur sulfatierten als auch zur nicht-sulfatierten Variante, wobei jedoch das Y-Peptid bevorzugt zu sein schien.

Die Kurven der Anisotropie-Messungen wurden auf Basis einer einseitigen spezifischen Bindung mithilfe von Formel 2.3 (Kapitel 2.5.2) gefittet. Aus der resultierenden Regressions-Kurve konnte nun die jeweilige Bindungs-Konstante ( $K_d$ ) abgelesen werden und so diejenige Protein-

Konzentration bestimmt werden, bei der ein jeweils 50 %iges Gleichgewicht zwischen gebundenen und ungebundenen Molekülen vorliegt.

Die ermittelten Werte der Bindungs-Konstanten mit entsprechender Abweichung sowie das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für alle Kombinationen aus verwendeten Proteinen und Peptiden sind in Tabelle 3.5 zusammengetragen.

**Tabelle 3.5 Übersicht über die Kenn-Werte der Fluoreszenz-Anisotropie-Assays**

	MANT-IN <sub>s</sub> YYTSA-OH			MANT-INYYTSA-OH		
	Kd [ $\mu$ M]	$\pm$ [ $\mu$ M]	$R^2$	Kd [ $\mu$ M]	$\pm$ [ $\mu$ M]	$R^2$
<b>GST</b>	679	1581	0,9077	1039	2846	0,9309
<b>GST-IRS1-PTB</b>	198	37	0,9970	124	30	0,9924
<b>GST-Mutante-1</b>	91	7	0,9993	88	11	0,9980
<b>GST-Mutante-2</b>	117	14	0,9984	1053	1439	0,9940
<b>GST-Mutante-3</b>	309	110	0,9949	145	63	0,9783

Mit einem Kd-Wert von rund 90  $\mu$ M ergab sich die beste Bindungs-Affinität für Mutante-1, wobei das sulfatierte und das nicht-sulfatierte Ziel-Peptid gleichermaßen angenommen wurden. Dagegen diskriminiert Mutante-2 deutlich zwischen der sulfatierten Variante mit einer Bindungs-Konstante von 117  $\mu$ M und der nicht-sulfatierten Variante, bei der der Kd-Wert genau 9-mal so hoch ist. Mutante-3 schließlich bindet das Y-Peptid im Rahmen der *Wildtyp*-IRS1-PTB-Domäne, wohingegen sich die Bindungs-Affinität zum <sub>s</sub>Y-Peptid deutlich verschlechterte.

## II Charakterisierung von Histatin1

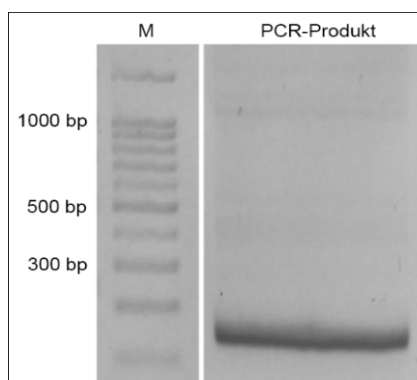
Als zweite Aufgabe sollte Histatin1 strukturell und funktionell charakterisiert werden. Dabei wurde sowohl synthetisches als auch rekombinant hergestelltes Peptid verwendet.

Für letzteres wurde zunächst das für Histatin1 codierende Gen in einen Expressionsvektor kloniert und die Expression des Proteins in *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen analysiert und optimiert. Anschließend wurde die Reinigung des exprimierten Fusionsproteins aus N-terminalem Histidin-tag, SUMO-Protein und Histatin1 etabliert. Das Peptid kam anschließend in verschiedenen NMR-spektroskopischen Experimenten, einem Hefe-Toxizitäts- und Wundheilungs-Assay zum Einsatz.

### 3.1 Klonierung von Histatin1

Um Histatin1 rekombinant in *E. coli* exprimieren zu können, wurde zunächst die zugehörige Gensequenz in einen Expressionsvektor mit T7-Promotor kloniert.

Das für Histatin1 codierende Gen (Firma *euofins*) wurde aus dem Transportvektor pEX-A2 mittels PCR amplifiziert und mit einer *BsaI*- sowie *BamHI*-Restriktionsschnittstelle versehen. Das resultierende Produkt (147 bp) wurde mithilfe eines Agarose-Gels identifiziert und gereinigt (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19 Amplifikation von Histatin1 aus dem Vektor pEX-A2**

Das PCR-Produkt weist unter Berücksichtigung der angehängten *BsaI*- und *BamHI*-Schnittstelle eine Größe von 147 bp auf. Als Größenmarker (M) wurde der mi-100bp eingesetzt.

Anschließend wurde das für Histatin1 codierende Gen in einen pET-SUMOadapt-Vektor mit N-terminalem Histidin-tag kloniert. Das bei der Expression entstehende SUMO-Fusionsprotein hat den Vorteil, dass es mithilfe der SUMO-Protease *Ulp1* spezifisch geschnitten und dabei natives Histatin1 erhalten werden kann. Die durch Ligation erstellten Klone wurden anschließend durch die Firma *GATC* sequenziert. Ein korrekter Klon wurde dann in Form von gereinigter Plasmid-DNA und als bei -80 °C in Glycerin gelagerte *E. coli*-Kultur konserviert.

## 3.2 Expression und Reinigung von Histatin1

Nach der erfolgreichen Klonierung eines Histatin1-codierenden Plasmids, sollte das Histidin-tag-SUMO-Histatin1-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden.

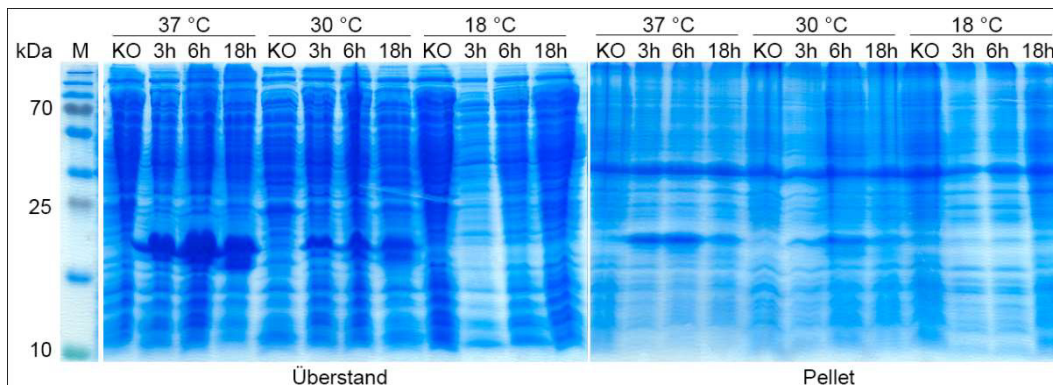
Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm C43 und wurde sowohl unter Verwendung von Vollmedium als auch von <sup>15</sup>N-angereichertem Phosphatmedium durchgeführt. Dadurch konnte neben dem rekombinanten Vergleichsprotein zum synthetischen Histatin1 auch isotopenmarkiertes Protein für bestimmte NMR-Experimente hergestellt werden. Die anschließende Reinigung wurde dann in zwei Etappen mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie durchgeführt.

### 3.2.1 Optimierung der Expressionsbedingungen für das Histidin-tag-SUMO-Histatin1

Um die optimalen Expressionsbedingungen für das Konstrukt His-SUMO-Histatin1 festlegen zu können, wurde zunächst ein Expressionstest unter Variation der Expressionsdauer sowie der Temperatur durchgeführt.



Als Expressionssystem wurde der *E. coli*-Stamm C43 eingesetzt. Die Probennahme erfolgte nach 3, 6 und 18 Stunden bei einer Expressionstemperatur von 37 °C, 30 °C und 18 °C. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe ohne die Induktion der Expression durch 0,5 mM IPTG kultiviert. Nach Aufschluss der Zellen wurden Überstände und Pellets in einer Tris-Tricin-PAGE (Kapitel 2.4.1) analysiert (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20 Proteinnachweis nach dem Expressionstest von His-SUMO-Histatin1**

Zum Nachweis des in *E. coli* C43 exprimierten Proteins wurden das linke Tris-Tricin-Gel mit den Überständen und das rechte mit den Pellet-Fractionen beladen. Als Größenmarker (M) diente der PRp. KO beschreibt die jeweiligen Proben ohne IPTG-Induktion. Die Expression bei 37 °C zeigt für alle Zeitpunkte eine deutliche Proteinbande bei etwa 20 kDa. Bei 30 °C fallen diese Banden bereits schwächer aus und sind bei 18 °C überhaupt nicht mehr erkennbar. Im Vergleich von Überstand und Pellet befindet sich der wesentliche Anteil des exprimierten His-SUMO-Histatin1 in der löslichen Fraktion.

Der Expressionstest zeigt eine starke Expression des 18,3 kDa-großen Histidin-tag-SUMO-Histatin1-Konstrukts bei 37 °C. Bei 30 °C ist diese deutlich abgeschwächt und findet bei 18 °C überhaupt nicht mehr statt. Nach 18 Stunden ergibt sich zwar das beste Überstand/Pellet-Verhältnis, eine Expression über diesen Zeitraum ist aber aufgrund der Zunahme an Abbauprodukten dennoch nicht sinnvoll. Daher wurden als optimale Expressionsbedingungen eine Temperatur von 37 °C und eine Expressionsdauer von 6 Stunden ausgewählt.

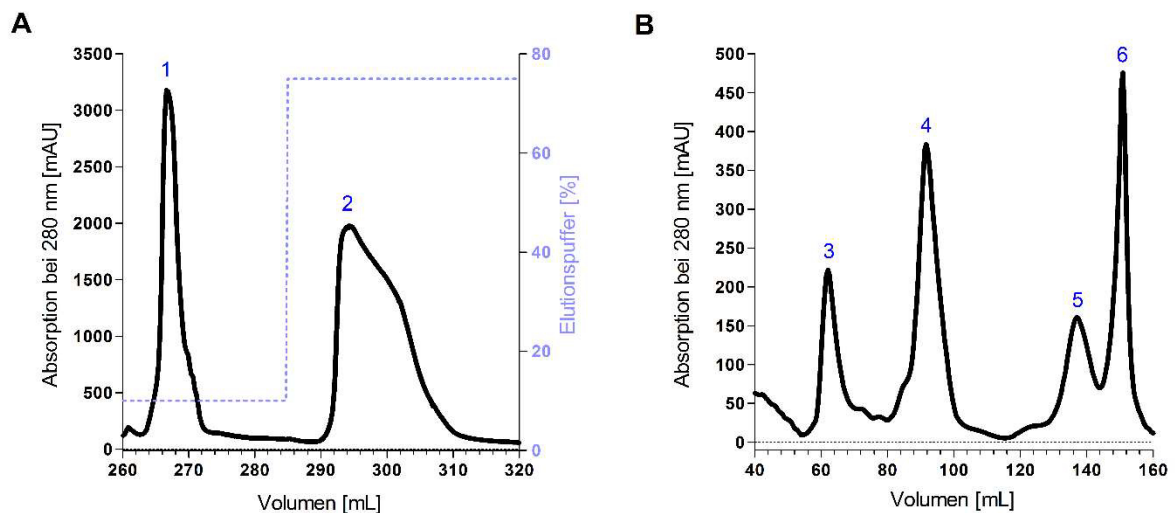
Nach Optimierung der Expression in Vollmedium, wurde unter Verwendung der gleichen Bedingungen auch eine Expression in Phosphatmedium mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das entwickelte Protokoll auch für die Herstellung von  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereichertem Histidin-tag-SUMO-Histatin1 praktikabel ist.

### 3.2.2 Etablierung der Reinigung von Histatin1

Für die Experimente zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung von Histatin1, wurde rekombinantes nicht-markiertes sowie  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkiertes Protein in sehr reiner Form benötigt. Daher musste das bei der Expression generierte Fusionsprotein mithilfe des 6xHistidin-tags über eine His-tag-IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) gereinigt und Histatin1 vom SUMO-Protein mittels SEC (*size exclusion chromatography*) getrennt werden (Kapitel 2.4.3).

Dazu wurden zunächst die Bakterienpellets der Expression durch Ultraschall aufgeschlossen (Kapitel 2.4.2). Das erhaltene Gemisch aus löslichen Proteinen wurde für die *His-tag-IMAC* verwendet. Dabei wurde das Proteingemisch auf eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule gegeben und die Elution mithilfe eines Stufengradienten des 250 mM Imidazol-haltigen His-Elutionspuffers eingeleitet. Während der Elutionsschritte wurde das gesamte Eluat in fraktionierter Form aufgefangen. Die Fusionsprotein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und in dem für die *SUMO*-Protease geeigneten Protease-Puffer diafiltriert sowie konzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend unter Anwesenheit der Protease inkubiert. Nach Spaltung des Histidin-*tag-SUMO*-Histatin1-Fusionsproteins wurden die einzelnen Bestandteile mittels *SEC* getrennt. Dafür wurde das konzentrierte Gemisch aus Histidin-*tag-SUMO*-Protein und Histatin1-Peptid auf die mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Säule gegeben. Die Elution wurde fraktioniert gesammelt und unter einem Signal erscheinende Fraktionen vereint. Anschließend wurden die Histatin1-enthaltenden Fraktionen [ggf. in NMR-Puffer diafiltriert und] konzentriert.

Das Chromatogramm der *His-tag-IMAC* zeigt kurz nach Beginn der Gradienten-Elution mit 10 % His-Elutionspuffer ein scharfes hohes Signal. Dies sollte auf nur schwach an der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix bindende endogene Proteine zurückzuführen sein. Das nächste Signal ist während der Elution mit 75 % His-Elutionspuffer zu erkennen und beinhaltet vermutlich die Elution von Histidin-*tag-SUMO*-Histatin1 (Abbildung 3.21 A). Das Chromatogramm der anschließenden *SEC* des geschnittenen Fusionsproteins zeigt dagegen während der Elution statt der zu erwartenden zwei insgesamt vier Maxima. Das gesuchte Zielprotein Histatin1 sollte aber aufgrund seiner kleineren Molekülgröße im letzten geteilten Signal zu finden sein (Abbildung 3.21 B).



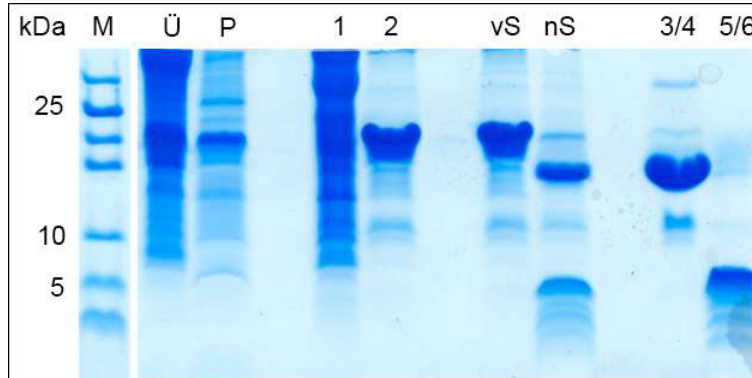
**Abbildung 3.21 Verlauf der Reinigung von rekombinantem Histatin1**

**A** zeigt den Verlauf der Elutionsschritte der *His-tag-IMAC* von Histidin-*tag-SUMO*-Histatin1. Der Konzentrationsverlauf des Stufengradienten ist in hellblau dargestellt. Dabei sollen die unspezifisch bindenden Verunreinigungen mit 10 % und das reine Fusionsprotein mit 75 % His-Elutionspuffer eluiert werden. Die Signalmaxima der Proteindetektion bei 280 nm sind nummeriert (1-2). **B** stellt den Verlauf der *SEC* zur Trennung des His-*SUMO*-Proteins vom Histatin1-Peptid dar. Dabei können während der Elution vier Signale bei 280 nm detektiert werden (3-6).

Um die einzelnen Schritte der Reinigung von Histatin1 nachvollziehen zu können, wurden während der einzelnen Etappen SDS-Proben erstellt und eine Tris-Tricin-*PAGE* durchgeführt



(Kapitel 2.4.1). Die generierten Proben umfassten Überstand und Pellet, die zwei Signalmaxima der *His-tag-IMAC*, das konzentrierte Fusionsprotein vor und nach dem Schneiden und die vier Signalmaxima der *SEC*. Dabei zeigt sich anhand des Tris-Tricin-Gels, dass Histidin-*tag-SUMO*-Histatin1 erfolgreich gereinigt, gespalten und so reines Histatin1 gewonnen werden kann (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22 Nachweis der Etappen der Reinigung von Histatin1**

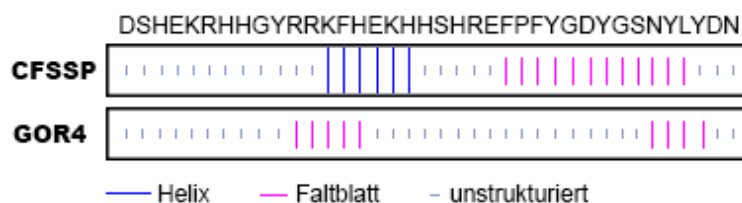
Das Tris-Tricin-Gel stellt den Proteinnachweis zu den einzelnen Reinigungsschritten dar. Als Größenmarker (M) wurde der PRuLR verwendet. Die Expression des Fusionsproteins zeigt sich sowohl im Überstand (Ü) als auch im Pellet (P) bei etwa 20 kDa. Die Nummerierung der Geltaschen entspricht der Nummerierung der Signalmaxima in den beiden Chromatogrammen. Durch vS und nS werden das ungeschnittene sowie das geschnittene Fusionsprotein mit 18,3 kDa bzw. 13,4 und 4,9 kDa gekennzeichnet.

Der Proteinnachweis der Reinigung von Histatin1 zeigt zunächst die erfolgreiche Expression des *SUMO*-Histatin1-Fusionsproteins bei 18,3 kDa. Das erste Signal der anschließenden *His-tag-IMAC* umfasst alle schwach bindenden Verunreinigungen, während das zweite Signal tatsächlich das reine Histidin-*tag-SUMO*-Histatin1 enthält. Der Schnitt des diafiltrierten, konzentrierten Fusionsproteins ist durch die Größenaufspaltung zu 13,4 kDa und 4,9 kDa nachvollziehbar. Diese Auftrennung wird auch durch die jeweils zusammengehörigen Signale der *SEC* deutlich. Dabei zeigt sich auch, dass die Reinheit des rekombinanten Histatin1 durch Abbauprodukte leicht gemindert wird.

### 3.3 Strukturelle Charakterisierung von Histatin1

Da die dreidimensionale Struktur von Histatin1 bisher nicht gelöst ist, sollte die Struktur des Peptids in wässriger Lösung mithilfe von NMR-Experimenten (nuclear magnetic resonance) bestimmt werden.

Als erster Schritt wurden aber zunächst Sekundärstrukturvorhersagen auf Basis der Sequenz von Histatin1 durchgeführt. Diese deuten mit 53 % bei CFSSP [212,213] und 76 % bei GOR4 [214] auf überwiegend unstrukturierte Bereiche hin. Außerdem gehen beide Vorhersageprogramme von einem Faltblatt im C-terminalen Bereich aus, während zwischen Aminosäure 11 und 18 entweder von einer Helix oder einem Faltblatt ausgegangen wird (Abbildung 3.23, nach [212-214]).



**Abbildung 3.23 Sequenzabhängige Sekundärstrukturvorhersage für Histatin1**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage von GOR4 [214] und die der Chou-Fasman-Strukturvorhersage CFSSP [212,213]. Beide sagen strukturierte Bereiche im mittleren und C-terminalen Bereich voraus. Der Großteil von Histatin1 wird aber als unstrukturiert (CFSSP = 53 %, GOR4 = 76 %) vorhergesagt.

### 3.3.1 NMR-spektroskopische Analyse der Struktur von Histatin1

#### 3.3.1.1 Bestimmung der Tertiärstruktur von Histatin1

Um die dreidimensionale Struktur von Histatin1 in hydrophiler Umgebung zu bestimmen, wurden zunächst drei verschiedene homonucleare 2D-Spektren mit synthetischem Histatin1 aufgenommen. Dabei handelte es sich um ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (*correlated spectroscopy*), ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY (*total correlation spectroscopy*) und ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (*nuclear overhauser enhancement spectroscopy*) (Kapitel 2.5.1).

Die erhaltenen Signale aus den Spektren wurden mittels *Chaintracing* nach Wüthrich [215] den entsprechenden Atomen zugeordnet (Anhang C) und für die Strukturrechnung mit *Cyana 2.1* verwendet. In Tabelle 3.6 sind die dazugehörigen Daten für die besten 10 aus 100 gerechneten Strukturen aufgelistet:

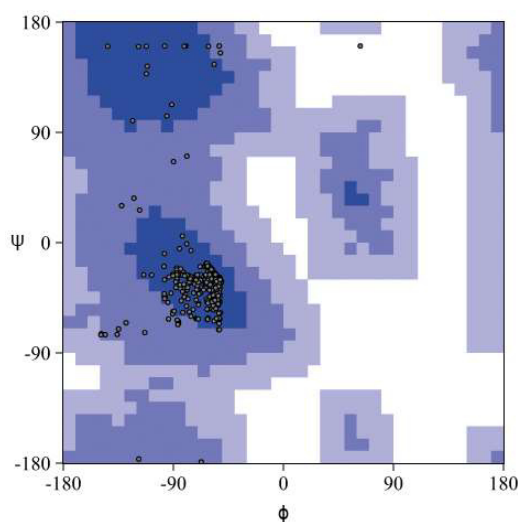
**Tabelle 3.6 Statistik des mit *Cyana 2.1* errechneten Ensembles aus 10 Histatin1-Strukturen**

Zuordnungs-Vollständigkeit	
Insgesamt	264
Fehlend	7
Vollständigkeit	96,9 %
NOE-Abstandsbeschränkungen	
Intraresidual ( $i, i$ )	134
Sequentiell ( $i, i + 1$ )	123
Mittelweit ( $\leq (i, i + 4)$ )	24
Weitreichend ( $> (i, i + 4)$ )	3
Total	284
Ramachandranplot-Regionen	
Favorisiert	89,4 %
Zusätzlich erlaubt	10,3 %
Außerhalb liegend	0,0 %
Nicht erlaubt	0,3 %

<b>RMSD (root mean square deviation)</b>	
Peptidrückgrat	4,06 +/- 0,78 Å
Schwere Atome	5,35 +/- 0,54 Å
Helix 1 (AS 4-8)	0,87 +/- 0,07 Å
Helix 2 (AS 11-23)	1,10 +/- 0,30 Å
Helix 3 (AS 26-38)	1,13 +/- 0,17 Å
<b>Durchschnittlicher Sekundärstrukturgehalt</b>	
α-Helix	84,2 %
Schleife/ ungeordnet	15,8 %

Insgesamt wurden 264 chemische Verschiebungen zugeordnet und damit eine Vollständigkeit von 96,7 % erreicht. Für die Strukturrechnung wurden 284 NOE-Signale verwendet. Die RMSD (*root mean square deviation*) über das Peptidrückgrat ist mit rund 4 Å sehr hoch. Bei Überlagerung der Helices aus den 10 Strukturen mithilfe des Programms *Pymol* ergibt sich mit 0,87 Å (Helix 1), 1,10 Å (Helix 2) und 1,13 Å (Helix 3) allerdings ein deutlich geringerer Wert. Damit beschränkt sich die hohe RMSD auf den mit durchschnittlich 15,8 % geringen Anteil an unstrukturierten Bereichen.

Der ebenfalls von *Cyana 2.1* ausgegebene Ramachandran-Plot für das Ensemble aus 10 Histatin1-Strukturen stellt die Distribution der Torsions-Winkel dar. Dabei befinden sich 89,4 % im favorisierten, 10,3 % im zusätzlich erlaubten und 0,3 % im nicht erlaubten Bereich (Abbildung 3.24).

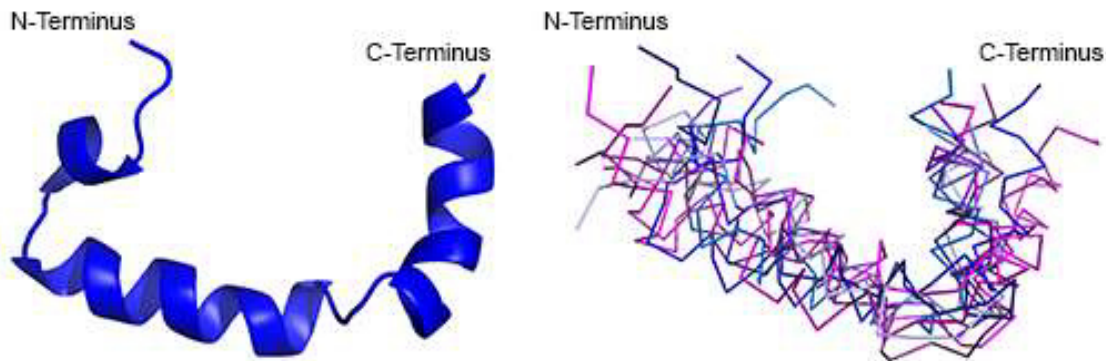


**Abbildung 3.24 Ramachandran-Plot des Histatin1-Ensembles**

Aufgetragen sind die Psi- gegen die Phi-Winkel des Peptidrückgrats.

Bei Betrachtung der mit *Cyana 2.1* berechneten Strukturen sind drei strukturierte Bereiche identifizierbar, die jeweils als α-Helix vorliegen. Eine kürzere Helix (AS 4-8) ist direkt am N-Terminus lokalisiert. Daran schließt sich, getrennt durch einen kurzen *Loop*, eine weitere Helix (AS 11-23) an. Am C-Terminus schließlich befindet sich die dritte Helix (AS 26-38). Diese

beginnt direkt nach Prolin 25, welches dadurch als Gelenk fungieren kann. Die beiden terminalen Helices verändern ihre relative Position zur mittleren Helix über alle 10 Strukturen des Ensembles. Die Überlagerung des Proteintrückgrats aller Strukturen zeigt aber insgesamt gesehen nur geringe Abweichungen (Abbildung 3.25).



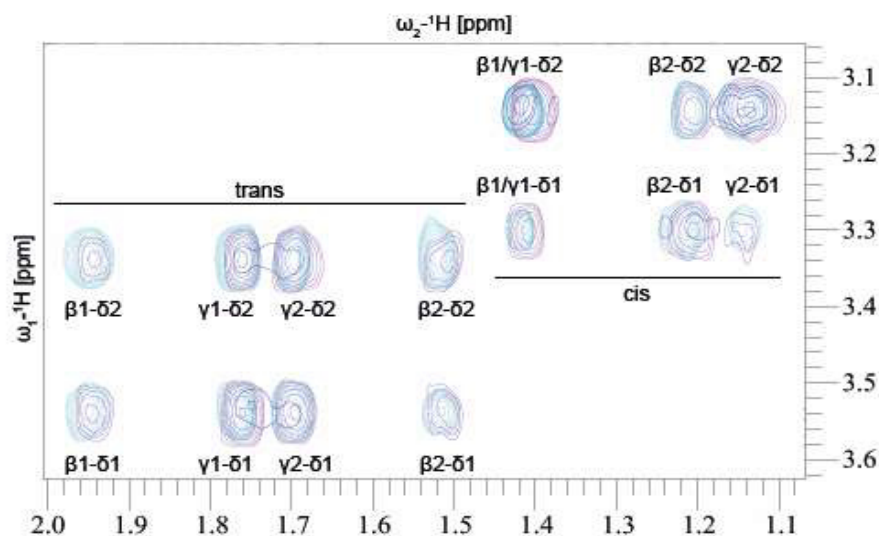
**Abbildung 3.25 Die Struktur von Histatin1**

Links dargestellt ist die errechnete Histatin1-Struktur in der *Cartoon*-Darstellung. Die drei Helices werden jeweils nur von einem 2-Aminosäuren-langen *Loop* getrennt. Dabei enthält der zweite *Loop* das Prolin 25-Gelenk. Rechts zu sehen sind die 10 besten aus 100 errechneten Strukturen in der *Ribbon*-Darstellung. Diese wurden anhand der mittleren Helix ausgerichtet. Dabei wird deutlich, dass die beiden terminalen Helices zwar ihre relative Position zur mittleren Helix verändern, das Strukturen-Ensemble aber insgesamt wenige Abweichungen zeigt.

### 3.3.1.2 Untersuchung des Isomeren-Verhältnis von Histatin1

Die bei der Strukturrechnung von Histatin1 verwendeten Spektren zeigten für Aminosäure 22 bis 33 jeweils zwei unterschiedliche Spinsysteme. Dies lässt sich wegen der Existenz eines Prolins an Position 25 auf eine *cis-trans*-Isomerisierung des Peptids zurückführen.

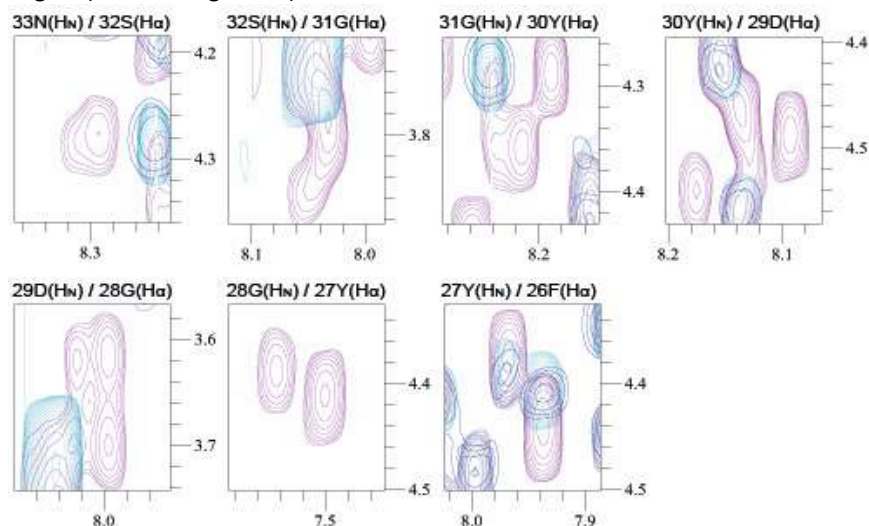
Zur Identifizierung der entsprechenden Konformation wurden zunächst die beiden Signal-Gruppen des Prolins untersucht. Dabei wurden die  $H_\beta$ - $H_\delta$ - bzw.  $H_\gamma$ - $H_\delta$ -Kopplungen anhand von experimentell bestimmten chemischen Verschiebungen für *cis*- und *trans*-Prolin [216,217] dem jeweiligen Konformer zugeordnet (Abbildung 3.26).



**Abbildung 3.26  $H_\beta$ - $H_\delta$ - und  $H_\gamma$ - $H_\delta$ -Kopplungen von *cis*- und *trans*-Prolin 25**

Dargestellt sind die COSY-, TOCSY- und NOESY-Signale von Prolin 25. Für die *cis*-Form liegen  $H_\beta$  und  $H_\gamma$  zwischen 1,1 ppm und 1,5 ppm, für das *trans*-Isomer zwischen 1,5 ppm und 2,0 ppm. Die Zuordnung erfolgte mithilfe bekannter chemischer Verschiebungen für die beiden isomeren Prolin-Formen [216,217].

Nach Identifizierung der beiden Konformationen, sollte das Verhältnis des für die Strukturrechnung genutzten *trans*-Isomers zur weniger populierten *cis*-Form ermittelt werden. Dafür wurden jeweils die zwei Zustände der benachbarten C-terminalen Aminosäuren verglichen. Als Indikator diente dabei die Intensität des HN-H $\alpha$ -NOESY-Signals der jeweiligen Aminosäuren zu ihrem Vorgänger (Abbildung 3.27).



**Abbildung 3.27 HN-H $\alpha$ -Kopplungen von Phe26 bis Ser32 in *cis*- und *trans*-Form**

Die einzelnen Abbildungen zeigen das NOESY-Signal (pink) der Kopplung des HN der jeweiligen Aminosäure zum H $\alpha$  ihrer Vorgänger-Aminosäure. Dabei gehört jeweils das rechte Signal zum *trans*- und das linke zum *cis*-Isomer.

In Tabelle 3.7 sind die errechneten Werte für das Verhältnis von *trans*- zu *cis*-Isomer für Phenylalanin 26 bis Serin 33 zusammengefasst:

**Tabelle 3.7 Verhältnis von *trans*- zu *cis*-Isomer für Phe26 bis Ser32**

Aminosäure	Sequenzposition	<i>trans</i> [%]	<i>cis</i> [%]
Phenylalanin	26	60	40
Tyrosin	27	67	33
Glycin	28	67	33
Aspartat	29	68	32
Tyrosin	30	72	28
Glycin	31	68	32
Serin	32	67	33

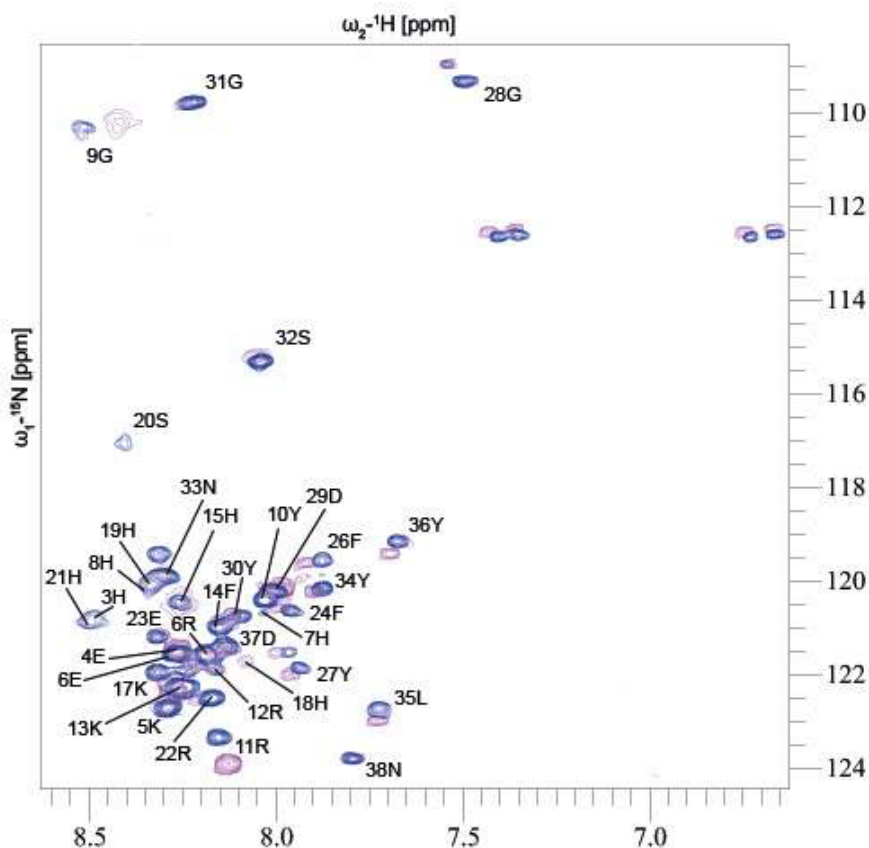
Damit liegt das Isomeren-Verhältnis von *trans*- zu *cis*-Histatin1 unter den angegebenen Messbedingungen (20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, c =1 mM, T =25°C) durchschnittlich bei 67:33.

### 3.3.1.3 Zuordnung des $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC von Histatin1

Da für weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen von Histatin1 ein vollständig zugeordnetes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum nötig war, wurde ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC unter

Nutzung des natürlich vorkommenden  $^{15}\text{N}$ -Isotops im synthetischen Peptid aufgenommen. Dabei konnten die  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen mithilfe der  $^1\text{H}$ -Zuordnungen aus den homonuclearen 2D-Spektren zugeordnet werden.

Um nachzuweisen, dass die errechnete Struktur für das synthetische Histatin1 auch für das rekombinante Peptid gültig ist, wurde mit diesem ebenfalls ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC aufgenommen. Die Überlagerung der beiden Spektren zeigte eine annähernde Deckungsgleichheit. Eine stärkere Verschiebung in Relation zum Spektrum des synthetischen Histatin1 war nur für die Aminosäure 9 bis 11 zu erkennen. Zusätzliche Signale sind auf Abbauprodukte des rekombinanten Peptids zurückzuführen (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28 Überlagerung des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC von rekombinantem und synthetischem Histatin1**

In den Spektren ist die jeweilige Kopplung der  $\text{H}_\text{N}$ -Protonen und den N-Atomen der einzelnen Aminosäuren dargestellt. Die den Signalen zugeordneten Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit ihrer entsprechenden Sequenzposition angegeben. Die blauen Signale gehören zum synthetischen Histatin1, die pinken zum rekombinanten Peptid. Beide Spektren wurden unter gleichen Messbedingungen in NMR-Puffer bei 25 °C aufgenommen. Sie sind annähernd deckungsgleich, bis auf einzelne stark verschobene Signale (9G, 10Y, 11R). Zudem sind einige zusätzliche Signale zu erkennen, welche auf Abbau-Produkte des rekombinanten Peptids zurückzuführen sind.

### 3.3.2 Untersuchung einer möglichen Multimerisierung von Histatin1

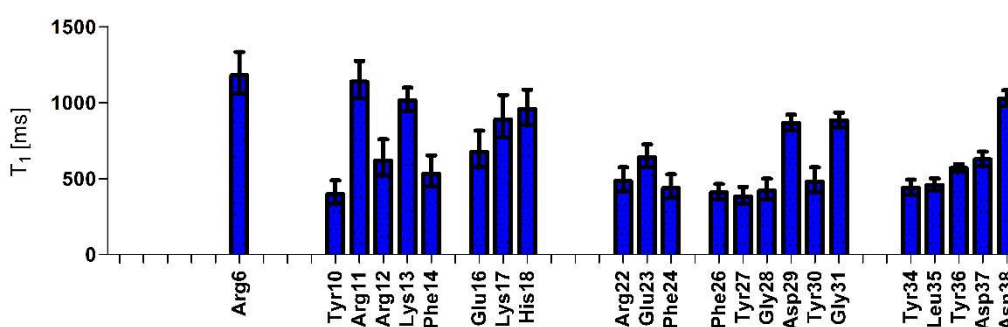
#### 3.3.2.1 Relaxationsmessungen und Abschätzung der Rotationskorrelationszeit von Histatin1

Zur Identifizierung einer möglichen Multimerisierung wurde zunächst  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereichertes Histatin1 NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei konnte mithilfe von Relaxationsmessungen



eine Abschätzung der Rotationskorrelationszeit ermittelt werden (Kapitel 2.5.1). Diese wiederum lässt Rückschlüsse auf die unter NMR-Bedingungen vorliegende Molekülgröße von Histatin1 zu. Für die Auswertung der Relaxationsmessungen war ein möglichst vollständig zugeordnetes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum nötig. Diese Zuordnung wurde auf eine Reihe von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren übertragen, welche unter Variation der Zeit  $\tau$  aufgenommen wurden. Die daraus resultierenden Intensitätsunterschiede der Signale der einzelnen Aminosäuren wurden gegen die entsprechenden Zeiten aufgetragen und mit Formel 2.1 gefittet. Dabei fanden für die Aussagen zu den  $T_1$ - und den  $T_2$ -Zeiten nur Kurvenanpassungen mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 \geq 0,90$  Verwendung.

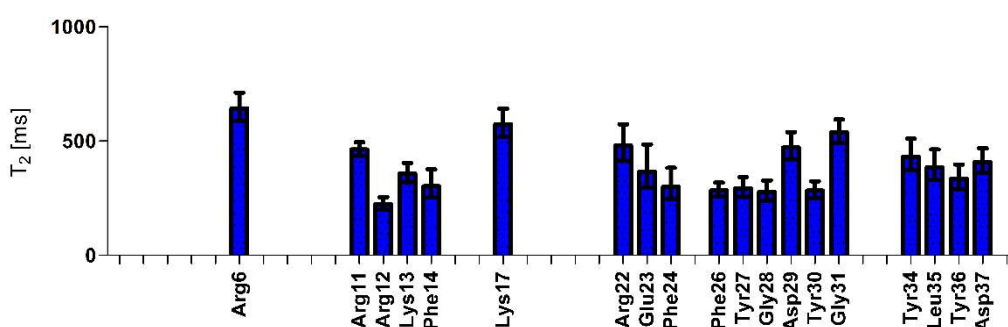
Die mittels Kurvenanpassung ermittelten  $T_1$ -Zeiten liegen über die Sequenz verteilt im Bereich von 400 - 1200 ms (Abbildung 3.29). Daraus ergibt sich für  $T_1$  ein gemittelter Wert von 675,25 ms.



**Abbildung 3.29** Ermittelte  $T_1$ -Zeiten für Histatin1

Aufgetragen sind die aus der Kurvenanpassung berechneten  $T_1$ -Zeiten mit Standardabweichung der einzelnen Aminosäuren gegen ihre jeweilige Sequenzposition.

Für  $T_2$  beträgt der Mittelwert 390,50 ms. Dabei variieren die berechneten  $T_2$ -Zeiten über die Sequenz gesehen nur in einem Intervall von 200-650 ms (Abbildung 3.30).



**Abbildung 3.30** Ermittelte  $T_2$ -Zeiten für Histatin1

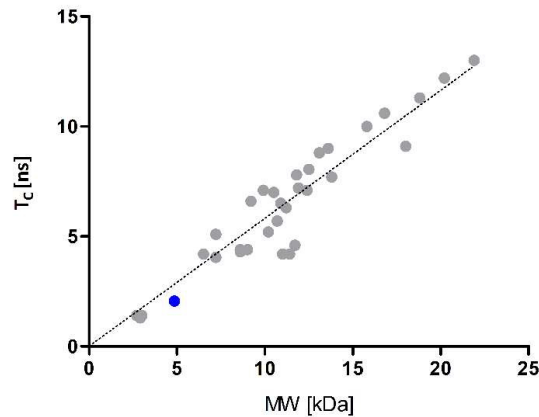
Aufgetragen sind die aus der Kurvenanpassung berechneten  $T_2$ -Zeiten mit Standardabweichung der einzelnen Aminosäuren gegen ihre jeweilige Sequenzposition.

Aus den gemittelten  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten von Histatin1 lässt sich nun mithilfe von Formel 2.2 (Kapitel 2.5.1) die zugehörige Rotationskorrelationszeit berechnen:

$$\tau_c = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot 70,971 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}} \sqrt{6 \cdot \frac{675,25 \text{ ms}}{390,50 \text{ ms}} - 7} = 2,06 \times 10^{-9} \text{ s} = 2,06 \text{ ns}$$

Somit ergibt sich für Histatin1 eine Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  von 2,06 ns. Zur Einordnung dieses Wertes werden die  $\tau_c$ -Werte ( $T_c$ [ns]) von unter vergleichbaren Bedingungen gemessenen

Proteinen [218,219] gegen ihr jeweiliges monomeres Molekulargewicht (MW [kDa]) aufgetragen. Anschließend lässt sich unter Berücksichtigung der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenanreicherung (MW = 4916,65 Da) die ermittelte Rotationskorrelationszeit von Histatin1 dazu in Relation setzen (Abbildung 3.31).



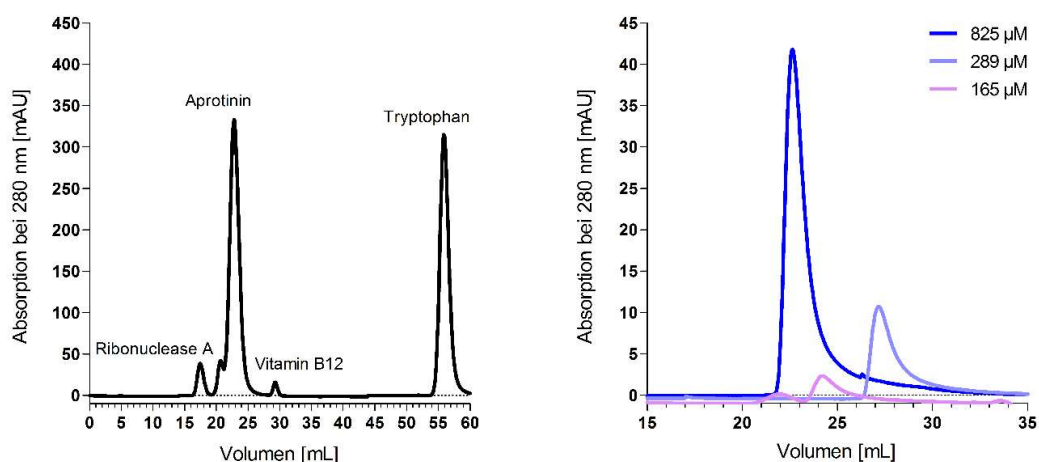
**Abbildung 3.31 Relation der Rotationskorrelationszeit von Histatin1 zu denen bekannter Proteine [218,219]**

In blau aufgetragen ist die errechnete  $\tau_c$  von Histatin1 gegen sein  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereichertes Molekulargewicht. Im Vergleich dazu sind die Werte der bekannten Monomere in grau dargestellt.

Anhand der Regressionslinie der Vergleichsproteine zeigt sich, dass Histatin1 unter den angegebenen Messbedingungen (20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5,  $c = 350 \mu\text{M}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ ) als Monomer vorliegt.

### 3.3.2.2 Analytische Größenausschlusschromatographie mit Histatin1

Als weiterer Ansatz zur Untersuchung einer möglichen Multimerisierung wurden analytische SECs (*size exclusion chromatography*) in Gelfiltrationspuffer unter Variation der Peptidkonzentration durchgeführt (Kapitel 2.4.4). Dabei lässt sich die Molekülgröße von Histatin1 mithilfe der Korrelation von Elutionsvolumen und Molekulargewicht abschätzen (Abbildung 3.32).



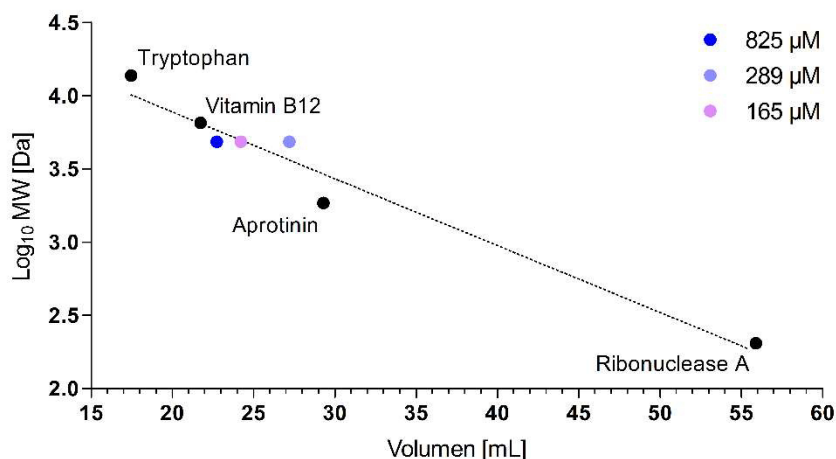
**Abbildung 3.32 Chromatogramme der analytischen Größenausschlusschromatographie**

Auf der linken Seite ist der Kalibrierungslauf mit den Monomeren bekannter Größe zu sehen. Rechts ist das Chromatogramm der SEC des synthetischen Histatin1 in der Konzentration von 825  $\mu\text{M}$ , 289  $\mu\text{M}$  und 165  $\mu\text{M}$  dargestellt. Dabei ist der Verlauf der Absorption bei 280 nm [mAU] gegen das Elutionsvolumen [mL] aufgetragen.



Die für die Auswertung nötige Kalibrierung erfolgte durch einen Gelfiltrationslauf mit bekannten monomeren Proteinen bzw. Substanzen. Anschließend wurde synthetisches Histatin1 in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt

Zur Auswertung wurde der dekadische Logarithmus des Molekulargewichts ( $\text{Log}_{10}\text{MW}$  [Da]) der bekannten Monomere gegen den Zeitpunkt ihrer Elution (Volumen [mL]) aufgetragen. Die entsprechende Korrelation des ermittelten Elutionsvolumen von Histatin1 mit seinem Molekulargewicht wurde mittels seiner theoretischen Monomergröße von 4848,2 Da dargestellt (Abbildung 3.33).



**Abbildung 3.33 Auswertung der konzentrationsabhängigen analytischen Größenausschlusschromatographie**

Die Kalibrierungsgerade ( $\text{Log}_{10}\text{MW}[\text{V}] = -0,0456\text{V} + 4,8013$ ,  $R^2 = 0,969$ ) wurde durch Auftragen des jeweiligen Molekulargewichts ( $\text{Log}_{10}\text{MW}$  [Da]) gegen das Elutionsvolumen (Volumen [mL]) erstellt. Die entsprechenden Punkte von Histatin1 mit dem ermittelten Elutionsvolumen und dem theoretischen Molekulargewicht des Monomers von 4848,2 Da sind farbig dargestellt.

Die experimentell ermittelten Molekulargewichte in den drei Gelfiltrationsläufen konnten mithilfe linearer Regression der Kalibrierungsgeraden errechnet werden und sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

**Tabelle 3.8 Zusammenstellung der Ergebnisse der analytischen Größenausschlusschromatographie von Histatin1**

Peptidkonzentration [mM]	V(Elution) [mL]	$\text{Log}_{10}\text{MW}$	MW [Da]
825	22,751	3,765	5821,57
289	27,191	3,561	3642,42
165	24,201	3,698	4985,80

Die Maxima der Signale der unterschiedlichen genutzten Peptidkonzentrationen liegen im Bereich eines Elutionsvolumens von 22-27 mL. Damit schwanken die kalkulierten Werte für das Molekulargewicht bei den einzelnen Konzentrationen zwischen 3,6 und 5,8 kDa. Da das Molekulargewicht eines Histatin1-Monomers bei 4,9 kDa liegt, bestätigen die Ergebnisse der analytischen SEC eine monomerische Form des Peptids.

### 3.4 Funktionelle Charakterisierung von Histatin1

Bisherige Studien haben für Histatin1 eindeutige Domänen mit speziellen funktionellen Eigenschaften identifiziert. So zeigt der N-Terminus antimikrobielle Aktivität, während die C-terminale Domäne Wundheilungs-Eigenschaften besitzt [108,178,179].

Für die Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von Histatin1 wurden das rekombinante (rek.Hist1) und das synthetische (synth.Hist1) Peptid im Vergleich eingesetzt. Außerdem sollten die Fähigkeiten einer kürzeren N- bzw. C-terminalen Variante determiniert werden. Tabelle 3.9 zeigt die eingesetzten Peptide mit ihrer zugehörigen Sequenz:

**Tabelle 3.9 Übersicht über die eingesetzten Varianten von Histatin1**

Peptid	Sequenz	MW [Da]
<b>rek.Hist1</b>	DSHEKRHHGYRRKFHEKHSHSHREFPFYGDYGSNYLYDN	4848,21
<b>synth.Hist1</b>	DSHEKRHHGYRRKFHEKHSHSHREFPFYGDYGSNYLYDN	4848,21
<b>N-Term.Hist1</b>	EKRHHGYRRKFH	1649,90
<b>C-Term.Hist1</b>	SHREFPFYGDYGS	1560,66
<b>sulf.C-Term.Hist1</b>	SHREFPF <sub>s</sub> YGDYGS	1640,64

Das N-terminale Fragment (N-Term.Hist1) wurde analog zum Peptid P-113 (AKRHHGYKRFH-NH<sub>2</sub>) aus Histatin5 ausgewählt, welches als kleinstes Fragment mit voller anticandidaler Aktivität identifiziert werden konnte [156]. Entsprechend wurde die C-terminale Variante (C-Term.Hist1) für Histatin1 bereits als minimal aktive Domäne im Wundheilungs-Assay erkannt [119]. Die sulfatierte Variante davon (sulf.C-Term.Hist1) wurde mithilfe der Studien zur Polysulfatierung des humanen Histatin1 ausgewählt [171].

#### 3.4.1 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von Histatin1

Die antimikrobielle Aktivität von Histatin1 lässt sich treffender als antifungale Aktivität beschreiben und ist auf den N-Terminus mit Aminosäure 1-24 zurückzuführen [134,220]. Aus diesem Grund wurde für den entsprechenden Toxizitäts-Assay (Kapitel 2.3.3) neben rekombinantem und synthetischem Histatin1 auch ein N-terminales Fragment eingesetzt.

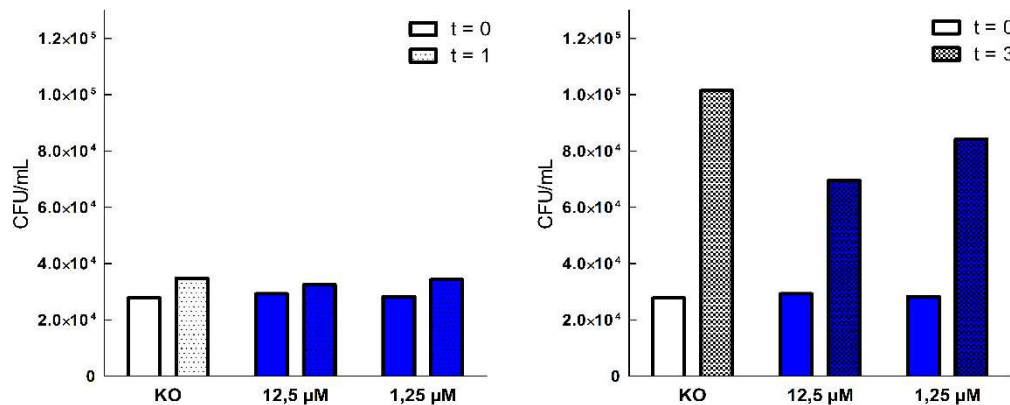
Der Toxizitäts-Assay richtete sich dabei gegen *S. cerevisiae*. Durch Zählen der Zellen vor und nach Inkubation mit den ausgewählten Peptiden konnte der inhibitorische Effekt auf das Wachstum der Hefen untersucht werden. Als Kontrolle diente dabei die Inkubation mit dem Puffer der Peptide (20 mM Kaliumphosphat, 150 mM NaCl).

##### 3.4.1.1 Optimierung der Inkubationszeit im Toxizitäts-Assay

Da die Zellzahl jeweils manuell durch Zählen der Kolonien auf der entsprechenden Agar-Platte ermittelt wurde, mussten zunächst die optimalen zeitlichen Bedingungen für die Inkubation der Hefen gefunden werden. Diese Auswahl basierte auf der Beachtung zweier limitierender

Faktoren. Zum einen musste die Inkubationszeit so lange wie nötig andauern, um einen inhibitorischen Effekt wahrnehmen zu können. Zum anderen musste sie aber auch so kurz wie möglich sein, damit die Zellzahl nach Inkubation zählbar blieb.

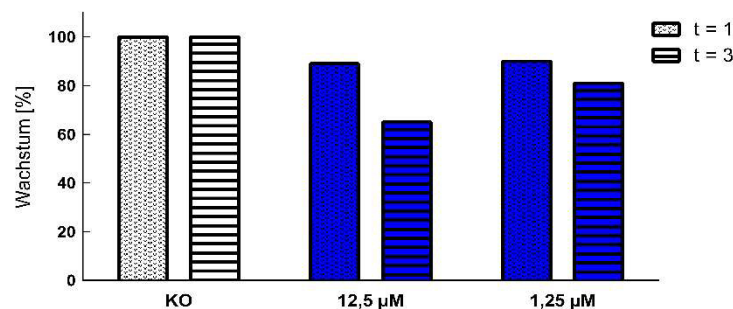
Um diese Faktoren zu ermitteln, wurden Inkubationszeiten von 1 h, 3 h und 6 h untersucht. Dabei wurde das rekombinante Histatin1 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Da bereits nach 6 h Inkubation die Zellzahl nicht mehr zählbar war, konnte nur das Ergebnis von 1 h und 3 h verglichen werden (Abbildung 3.34).



**Abbildung 3.34 Zellzahlen von *S. cerevisiae* nach 1 h und 3 h Peptid-Inkubation**

Links sind die Zellzahlen in CFU/mL zu Beginn und nach 1 h Inkubation aufgetragen, rechts zu Beginn und nach 3 h Inkubation. Dabei wurden jeweils die Kontrolle mit 0 µM rekombinantes Peptid (KO) sowie die beiden Peptid-Konzentrationen von 12,5 µM und 1,25 µM ausgezählt.

Nach 1 h zeigt die Kontrolle einen Zuwachs von 7000 CFU/mL (*colony forming units per milliliter*). Für eine Konzentration von 1,25 µM des rekombinanten Peptids ergibt sich ein Zuwachs von 6000 CFU/mL und für das 10fach-höher konzentrierte von 3200 CFU/mL. Zwei Stunden später hat sich der Zuwachs der Kontrolle auf 73700 CFU/mL und der der beiden Peptid-Konzentrationen auf 55900 CFU/mL bzw. 40200 CFU/mL erhöht. Mithilfe der ermittelten Werte lässt sich nun die Inhibition des Hefe-Wachstums im Vergleich zur Kontrolle bestimmen (Abbildung 3.35).



**Abbildung 3.35 Inhibition des Wachstums von *S. cerevisiae* nach 1 h und 3 h Peptid-Inkubation**

Dargestellt ist der prozentuale Zuwachs der Hefen nach 1 h und 3 h im Vergleich zur Kontrolle mit 0 µM rekombinantes Peptid (KO). Das Wachstum für das 12,5 µM bzw. 1,25 µM Peptid liegt dabei unter 100 % und ist mit einer entsprechenden Inhibition gleichzusetzen.

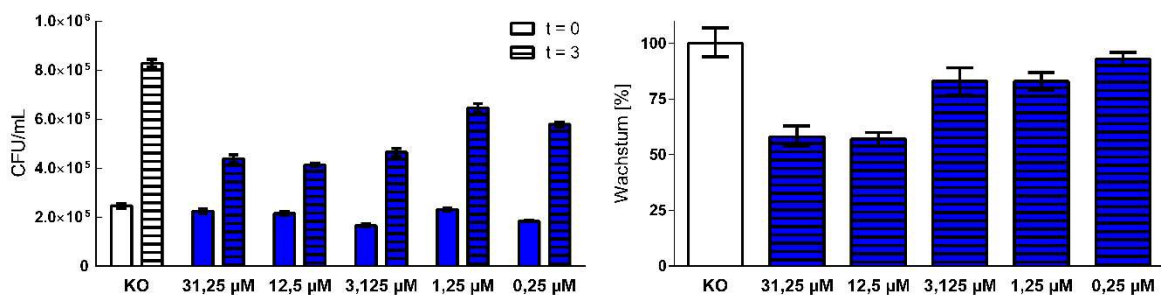
Das Wachstum der Kontrolle nach 1 h und 3 h wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Damit ergibt sich für das 12,5 µM-konzentrierte Peptid eine Inhibition des Wachstums von 11 % nach 1 h und 35 % nach 3 h. Für das 1,25 µM-konzentrierte Peptid liegt die Wachstums-Inhibition bei 10 % bzw.

19 %. Obwohl der inhibitorische Effekt von Histatin1 bereits nach 1 h Inkubation sichtbar ist, lässt sich der Einfluss der Konzentration des Peptids erst nach 3 h ermitteln. Daher wurde für weitere Toxizitäts-Assays die dreistündige Inkubationszeit verwendet.

### 3.4.1.2 Analyse des Einflusses der Peptid-Konzentration im Toxizitäts-Assay

Nachdem die Inkubationszeit im Toxizitäts-Assay optimiert worden war, konnte der inhibitorische Effekt des rekombinanten und synthetischen sowie des N-terminalen Peptids untersucht werden. Dabei wurden die drei jeweils in fünf unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um so ggf. eine Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts auf das Wachstum von *S. cerevisiae* nachweisen zu können.

Zunächst wurde noch einmal das Wachstum unter Einfluss des rekombinanten Peptids konzentrationsabhängig untersucht (Abbildung 3.36).

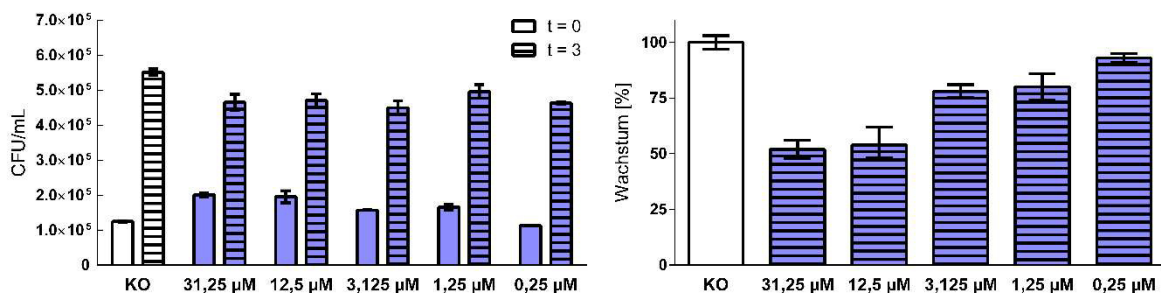


**Abbildung 3.36 Einfluss des rekombinanten Histatin1 auf das Wachstum von *S. cerevisiae***

Links dargestellt sind die Zellzahlen in CFU/mL nach 3 h Stunden Inkubation mit rek.Hist1. Die Konzentration des Peptids im Hefe-Medium liegt dabei bei 0 µM für die Kontrolle (KO) sowie zwischen 0,25 µM und 31,25 µM. Rechts ist die dazugehörige Auswertung zu sehen. Das Wachstum der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt, dementsprechend reicht die Wachstums-Inhibition durch das Peptid konzentrationsabhängig von 7 % bis 43 %.

Unter Anwesenheit des rekombinanten Histatin1 geht das Wachstum bei Peptidkonzentrationen im Bereich von etwa 10 µM bis 30 µM auf knapp 55 % zurück. Bei einer 10fach-niedrigeren Konzentration liegt es bei gut 85 %. Für die geringste Konzentration von 0,25 µM rekombinantes Peptid lässt sich ein Rückgang auf rund 95 % Wachstum ausmachen.

Zum Vergleich der Funktionsfähigkeit von rekombinantem und synthetischem Peptid wurde dasselbe Experiment auch mit der synthetischen Variante von Histatin1 durchgeführt (Abbildung 3.37).

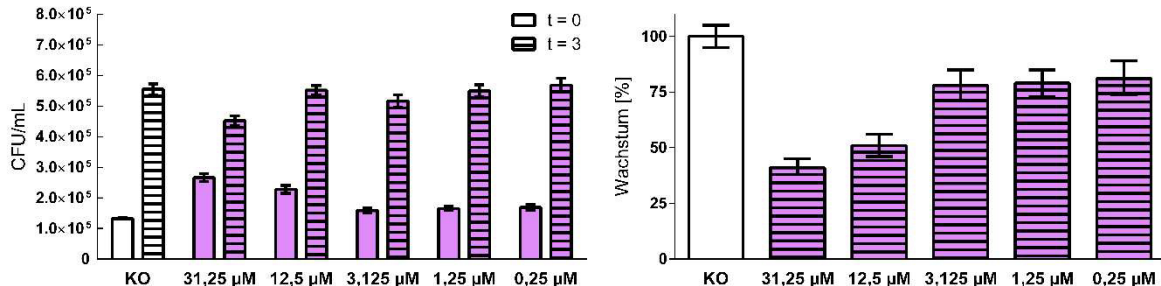


**Abbildung 3.37 Einfluss des synthetischen Histatin1 auf das Wachstum von *S. cerevisiae***

Links dargestellt sind die Zellzahlen in CFU/mL nach 3 h Stunden Inkubation mit synth.Hist1. Die Konzentration des Peptids im Hefe-Medium liegt dabei bei 0 µM für die Kontrolle (KO) sowie zwischen 0,25 µM und 31,25 µM. Rechts ist die dazugehörige Auswertung zu sehen. Das Wachstum der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt, dementsprechend reicht die Wachstums-Inhibition durch das Peptid konzentrationsabhängig von 7 % bis 48 %.

Dabei zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Das Wachstum für die geringste Peptid-Konzentration geht ebenfalls auf rund 95 % zurück. Entsprechend der Zehnerpotenz liegt das Wachstum unter Anwesenheit des höher konzentrierten Peptids bei 85 % bzw. 55 %.

Abschließend wurde der inhibitorische Effekt des N-terminalen Fragments von Histatin1 untersucht (Abbildung 3.38).

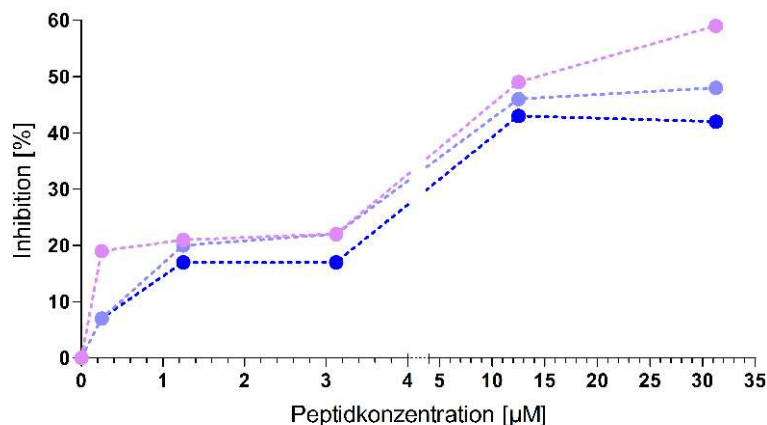


**Abbildung 3.38 Einfluss des N-terminalen Histatin1 auf das Wachstum von *S. cerevisiae***

Links dargestellt sind die Zellzahlen in CFU/mL nach 3 h Stunden Inkubation mit N-Term.Hist1. Die Konzentration des Peptids im Hefe-Medium liegt dabei bei 0  $\mu\text{M}$  für die Kontrolle (KO) sowie zwischen 0,25  $\mu\text{M}$  und 31,25  $\mu\text{M}$ . Rechts ist die dazugehörige Auswertung zu sehen. Das Wachstum der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt, dementsprechend reicht die Wachstums-Inhibition durch das Peptid konzentrationsabhängig von 19 % bis 59 %.

Für die niedrigsten drei Peptidkonzentrationen von 0,25  $\mu\text{M}$  bis 3,125  $\mu\text{M}$  geht das Wachstum der Hefen dabei auf rund 80 % zurück. Für 12,5  $\mu\text{M}$ -konzentriertes Peptid liegt es bei gut 50 % und sinkt bei einer Peptid-Konzentration von 31,25  $\mu\text{M}$  sogar auf knapp 40 %.

Zusammengefasst lassen sich die Ergebnisse der Toxizitäts-Assays nun anhand eines konzentrationsabhängigen Verlaufs der entsprechenden Inhibition beschreiben (Abbildung 3.39).



**Abbildung 3.39 Konzentrationsabhängiger Verlauf der Wachstums-Inhibition von *S. cerevisiae* unter Anwesenheit von Histatin1-Varianten**

Dargestellt ist der inhibitorische Effekt von rek.Hist1 (blau), synth.Hist1 (violett) und N-Term.Hist1 (pink) auf das Wachstum der Hefen. Dabei zeigen das rekombinante und das synthetische Peptid einen ähnlichen Kurvenverlauf, während der N-Terminus insgesamt eine stärkere Inhibition aufweist.

Für das rekombinante und synthetische Peptid ergibt sich ein annähernd gleicher Kurvenverlauf. Dabei entstehen abhängig von der Zehnerpotenz der Peptid-Konzentration Plateaus im Verlauf des inhibitorischen Effekts. So ist die Inhibition unter Anwesenheit von weniger als 1  $\mu\text{M}$  Peptid nur bei 5 %. Für eine 10fach höhere Peptidkonzentration steigt sie bereits auf etwa 15 %. Eine weitere 10fache Erhöhung der Konzentration bewirkt dann sogar eine Inhibition des Hefen-



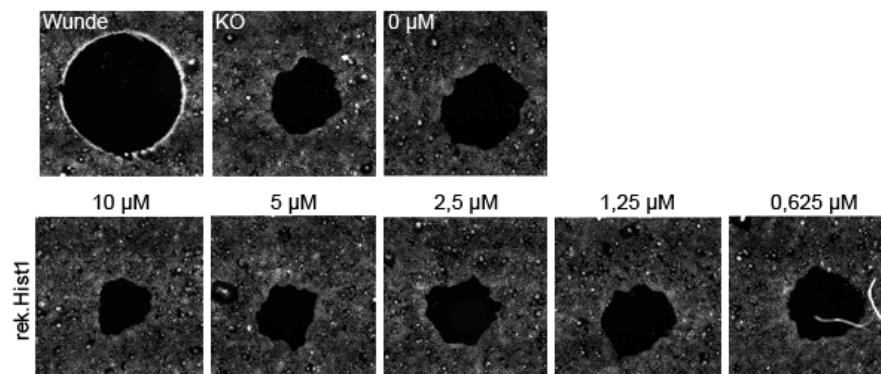
Wachstums von gut 45 %. Für das gewählte N-terminale Fragment von Histatin1 folgt der Kurvenverlauf der Wachstums-Inhibition einem anderen Muster. So zeigen Konzentrationen unter 5  $\mu\text{M}$  Peptid bereits einen konstanten inhibitorischen Effekt von gut 20 %. Steigt die Peptidkonzentration auf über 10  $\mu\text{M}$ , ist die Inhibition bereits bei 50 % und erreicht bei mehr als 30  $\mu\text{M}$  Peptid sogar einen Wert von 60 %.

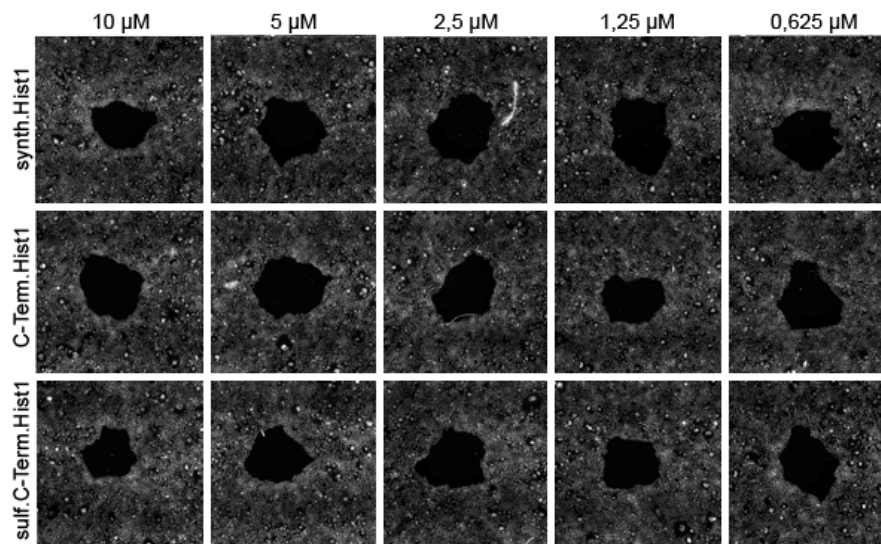
Damit zeigt der gewählte N-Terminus im Vergleich mit Histatin1 in voller Länge einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von *S. cerevisiae*. Dies äußert sich vor allem an zwei entscheidenden Punkten des Kurvenverlaufs. So bleibt zum einen die Inhibitions-Wirkung für die ersten beiden Zehnerpotenzen der Peptidkonzentration konstant. Zum anderen zeigt sich im weiteren Kurvenverlauf für den verwendeten Konzentrationsbereich keine obere Schranke des inhibitorischen Effekts. Damit ist eine weitere Steigerung der Inhibition des Hefen-Wachstums bei zunehmender Peptidkonzentration zu vermuten.

### 3.4.2 Untersuchung der Wundheilungs-Eigenschaften von Histatin1

Eine weitere funktionelle Eigenschaft von Histatin1 konnte in Zellkultur-Assays identifiziert werden und betrifft die Fähigkeit des Peptids als Hauptwundheilungs-Faktor im menschlichen Speichel zu agieren [118]. Dabei konnte durch systematische Verkürzung von N- und C-Terminus letztendlich ein C-terminales Fragment mit einer Länge von 13 Aminosäuren gefunden werden, welches als minimal aktive Domäne volle Wundheilungs-Eigenschaften besitzt [119]. Daher wurde für den entsprechenden Wundheilungs-Assay (Kapitel 2.3.4) neben rekombinantem und synthetischem Peptid auch dieses C-terminale Fragment im Vergleich mit seiner sulfatierten Variante verwendet.

Der Wundheilungs-Assay wurde mit der humanen bukkalen Epithel-Zelllinie *TR146* durchgeführt. Dabei wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und nach Erzeugung einer Wunde unter Anwesenheit der ausgewählten Peptide inkubiert. Die Wundschließung wurde nach 12 h Inkubation mikroskopisch bestimmt und mit einer frischen Wunde verglichen. Als Kontrolle diente zum einen eine Inkubation mit Zellkultur-Medium, aber auch mit dem Puffer der Peptide (20 mM Kaliumphosphat, 150 mM NaCl). Durch den Einsatz von fünf verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Peptide, konnte dabei eine konzentrationsabhängige Wundschließung beobachtet werden (Abbildung 3.41).

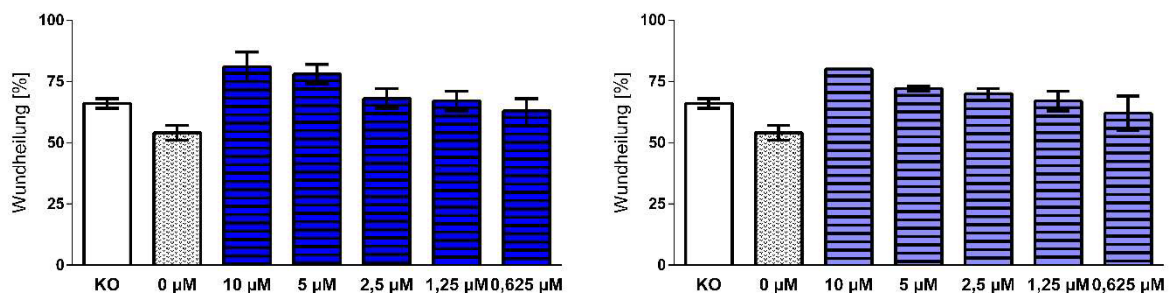




**Abbildung 3.41 Wundschließung nach Inkubation mit Histatin1-Varianten**

Die oberste Reihe zeigt eine frische Wunde sowie die Kontrollen mit Zellkultur-Medium (KO) und Peptid-Puffer (0 µM). In den anderen Reihen ist die Wundschließung nach 12 h Inkubation mit rek.Hist1, synth.Hist1, C-Term.Hist1 und sulf.C-Term.Hist1 bei Peptid-Konzentrationen von 0,625 µM bis 10 µM zu sehen.

Bereits anhand der Mikroskopie-Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Wundschließung bei Inkubation mit rekombinantem und synthetischem Histatin1 mit abnehmender Peptid-Konzentration schlechter wird. Dagegen haben sich die Wunden unter Anwesenheit der C-terminalen Fragmente annähernd gleich schnell geschlossen. Um diesen Effekt quantifizieren zu können, wurde über die nicht geschlossene Fläche integriert und die prozentuale Schließung im Vergleich zur frischen Wunde bestimmt. Auf diese Weise konnte zunächst die Wundheilung mit rekombinantem und synthetischem Histatin1 verglichen werden (Abbildung 3.40).

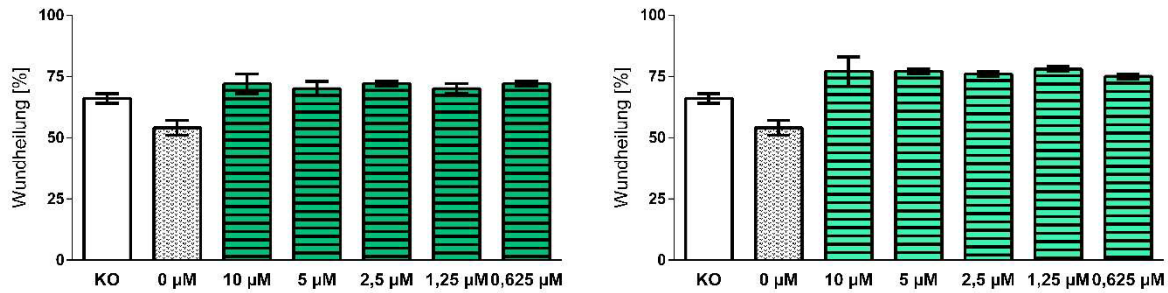


**Abbildung 3.40 Wundheilung unter Anwesenheit von rekombinantem und synthetischem Histatin1**

Rechts ist die Heilung nach 12 h Inkubation mit rek.Hist1 dargestellt, links mit synth.Hist1. Als Kontrolle wurde nur mit Zellkultur-Medium (KO) sowie mit dem entsprechenden Anteil an Peptid-Puffer (0 µM) inkubiert. Die Peptid-Konzentrationen liegen zwischen 0,625 µM und 10 µM.

Unter Anwesenheit des rekombinanten Peptids liegt die Wundheilung für eine Konzentration von 0,625 µM über 60 %. Für die doppelte und vierfache Peptidkonzentration steigt der Wundheilungs-Effekt auf rund 70 % und erreicht bei den höchsten zwei verwendeten Konzentrationen von 5 µM sowie 10 µM sogar 80 %. Bei Inkubation mit dem synthetischen Peptid ergeben sich annähernd gleiche Werte.

Dagegen zeigen die Werte der Wundheilung unter Anwesenheit der beiden Varianten des C-terminalen Fragments einen gleichbleibenden Verlauf (Abbildung 3.42).

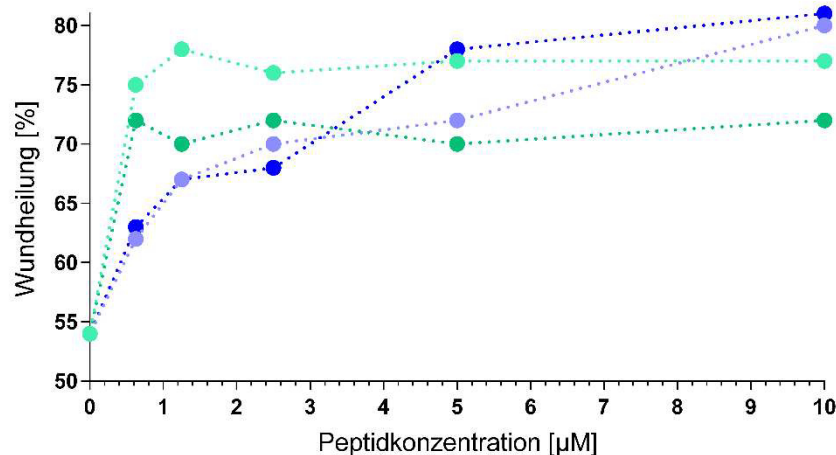


**Abbildung 3.42 Wundheilung unter Anwesenheit des C-terminalen Fragments von Histatin1 in nicht-sulfatierter und sulfatierter Variante**

Rechts ist die Heilung nach 12 h Inkubation mit C-Term.Hist1 dargestellt, links mit sulf.C-Term.Hist1. Als Kontrolle wurde nur mit Zellkultur-Medium (KO) sowie mit dem entsprechenden Anteil an Peptid-Puffer (0 µM) inkubiert. Die Peptid-Konzentrationen liegen zwischen 0,625 µM und 10 µM.

Für die nicht-sulfatierte Variante liegt die Wundheilung für alle verwendeten Peptid-Konzentrationen bei rund 70 %. Das sulfatierte C-terminale Fragment von Histatin1 erreicht sogar eine konstante Heilung von über 75 %.

Zusammengefasst lassen sich die Ergebnisse des Wundheilungs-Assays nun anhand eines konzentrationsabhängigen Verlaufs der entsprechenden prozentualen Wundheilung beschreiben (Abbildung 3.43).



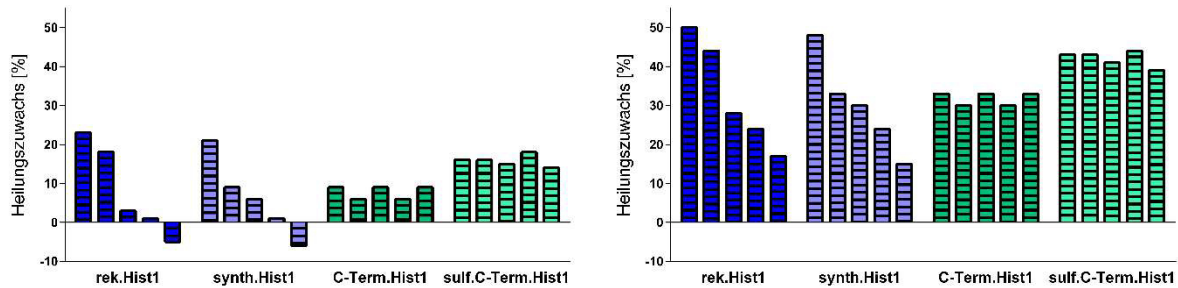
**Abbildung 3.43 Konzentrationsabhängiger Verlauf der prozentualen Wundheilung von TR146-Zellen unter Anwesenheit von Histatin1-Varianten**

Dargestellt ist die Wundheilung mit rek.Hist1 (blau), synth.Hist1 (violett), C-Term.Hist1 (grün) und sulf.C-Term.Hist1 (türkis). Während sich die prozentuale Wundheilung unter Anwesenheit des rekombinanten sowie des synthetischen Peptids stark konzentrationsabhängig zeigt, ist der Verlauf der beiden Varianten des C-terminalen Fragments weitgehend konstant.

Für das rekombinante und das synthetische Histatin1 ergibt sich ein annähernd gleicher Kurvenverlauf. Dabei steigt die prozentuale Wundheilung mit zunehmender Peptidkonzentration von knapp 65 % bei 0,625 µM Peptid bis auf etwa 80 % bei 10 µM Peptid. Dagegen zeigt sich die Wundheilung unter Anwesenheit der sulfatierten und nicht-sulfatierten Variante des C-terminalen Fragments von Histatin1 im verwendeten Konzentrationsbereich nicht konzentrationsabhängig. Die prozentuale Heilung bei Einsatz des sulfatierten C-Terminus liegt hier konstant bei gut 75 %, die der nicht modifizierten Variante ist um 5 % schlechter.



In Relation zur Kontrolle lässt sich mithilfe dieser Werte der durch die Peptide hervorgerufene Wundheilungs-Effekt bestimmen. Dabei wird die Wundheilung der Kontrolle auf 100 % gesetzt und eine Überschreitung dieses Wertes als prozentualer Heilungszuwachs interpretiert. Die Wundheilung bei Inkubation mit Zellkultur-Medium lag bei 66 %, die der Inkubation mit dem entsprechenden Anteil an Peptid-Puffer aber nur bei 54 %. Daher ist von einem negativen Einfluss des Puffers auf die Wundheilung auszugehen. Für die Auswertung wurde daher zunächst das Zellkultur-Medium als Referenz gesetzt und anschließend der negative Puffereffekt herausgerechnet (Abbildung 3.44).



**Abbildung 3.44 Heilungszuwachs bei Inkubation mit Histatin1-Varianten**

Rechts ist der Wundheilungs-Effekt für rek.Hist1, synth.Hist1, C-Term.Hist1 und sulf.C-Term.Hist1 in Relation zur Inkubation mit Zellkultur-Medium zu sehen. Links wurde der verminderte Heilungszuwachs durch den negativen Puffereffekt hinzu gerechnet. Die Differenz liegt dabei zwischen 21 %- und 27 %-Punkten.

Wird nur die Inkubation mit Zellkultur-Medium als Referenz gesetzt, liegt der jeweilige prozentuale Heilungszuwachs durch die Peptide zwischen 21 %- und 27 %-Punkten niedriger als bei Korrektur des Puffer-Effekts. Dadurch zeigen niedrige Peptid-Konzentrationen einen negativen Wundheilungs-Effekt. Der tatsächliche Effekt der Peptid-Inkubation auf die Wundheilung wird daher in Tabelle 3.10 mithilfe der korrigierten Werte angegeben.

**Tabelle 3.10 Übersicht über den Heilungszuwachs bei Inkubation mit Histatin1-Varianten [in %]**

Peptid	Peptid-Konzentration [ $\mu$ M]				
	10	5	2,5	1,25	0,625
rek.Hist1	50	44	28	24	17
synth.Hist1	48	33	30	24	15
C-Term.Hist1	33	30	33	30	33
sulf.C-Term.Hist1	43	43	41	44	39

Für rekombinantes und synthetisches Histatin1 zeigt sich ein ähnlicher Wundheilungs-Effekt. So ergibt sich je nach Konzentration des Peptids eine verbesserte Wundheilung von etwa 15 % bis zu 50 %. Für das unmodifizierte C-terminale Fragment von Histatin1 ergibt sich ein konstanter Heilungszuwachs von knapp 35 %. Dagegen erreicht die sulfatierte Variante dieses Fragments eine Verbesserung der Wundheilung von mehr als 40 %. Damit liegt der Heilungszuwachs der C-Termini zwar unterhalb des Maximums von Histatin1 in voller Länge, zeigt dafür aber eine konzentrationsunabhängige Verbesserung der Wundheilung.

## 4 DISKUSSION

### I Identifikation von CCR5-Bindern

Als erster Aspekt dieser Arbeit wurden mithilfe einer kombinatorischen Protein-Bibliothek Binder für eine Sequenz aus dem N-Terminus des CCR5-Rezeptors identifiziert. Dieser besitzt im Hinblick auf die Sulfatierung von Tyrosinen große Relevanz, da der HIV-Zelleintritt durch Bindung der viralen Hüllproteine an die entsprechenden N-terminalen Sulfo-Tyrosine dieses Corezeptors eingeleitet wird.

Bisherige Arbeiten zur allosterischen Inhibition der Corezeptor-Funktion beschränken sich auf die ebenfalls an einer Bindung beteiligten extrazellulären *Loop*-Regionen. So bewirkt beispielsweise der CCR5-Antagonist *Maraviroc* (Pfizer) eine Konformations-Änderung des Rezeptors, welche letztendlich die Wechselwirkung von ECL-2 mit der V3-Schleife des gp120-Proteins verhindern kann [221]. Da allerdings die initiale Bindung des Hüllproteins auf die sulfatierten Tyrosine an Position 10 und 14 des CCR5-Rezeptors zurückgeht, war es ein Ziel dieser Arbeit, einen alternativen Binder zu finden, der nicht nur aus einer Sequenz-spezifischen sondern auch aus einer Sulfat-spezifischen Selektion hervorgehen sollte.

So wurde innerhalb dieser Arbeit eine Protein-Bibliothek auf Basis der Phospho-Tyrosin-bindenden Domäne des IRS1 entwickelt und ihre Bestandteile mithilfe eines Ribosomen-Displays auf ihre Bindungs-Fähigkeit gegenüber der sulfatierten und nicht-sulfatierten Variante des Heptapeptids CCR5<sup>12-18</sup> untersucht. Dabei konnten drei vielversprechende Mutanten ausgewählt und ihre Bindungs-Affinität gegenüber dem Ziel-Peptid in einem Fluoreszenz-Anisotropie-Assay ermittelt werden.

#### 4.1 Die Spezifität der identifizierten Binder

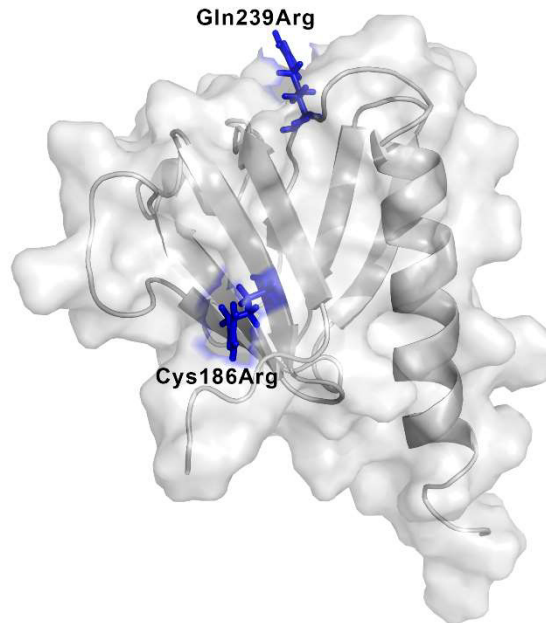
---

Die Fähigkeit löslicher sulfatierter Peptide eine Interaktion von gp120 mit dem CCR5 zu inhibieren, zeigt die hohe Affinität zwischen dem Hüllprotein und den N-terminalen Sulfo-Tyrosinen des Corezeptors [88]. In dieser Arbeit sollte daher ein spezifischer Binder für den entsprechenden Sequenz-Abschnitt des Rezeptors identifiziert werden.

##### 4.1.1 Mutante-1 ist ein Sequenz-spezifischer Binder für IN<sub>S</sub>YYTSA und INYYTSA

Bei Analyse der durch das Ribosomen-Display selektierten Binder dominierte eine doppelte Arginin-Mutante (Tabelle 3.3). Diese zeigte im Vergleich mit dem *Wildtyp* der IRS1-PTB-Domäne eine gesteigerte Bindungs-Affinität und differenzierte nicht zwischen sulfatierter und nicht-sulfatierter Variante des Ziel-Peptids (Abbildung 3.16). Demensprechend wurde mit dieser sogenannten Mutante-1 vermutlich ein Sequenz-spezifischer Binder identifiziert.

Durch Übertragung der beiden Arginin-Mutationen auf die Struktur der IRS1-PTB-Domäne lässt sich eine mögliche Bindungstasche für das IN<sub>5</sub>YYTSA- bzw. INYYTSA-Peptid ausmachen (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1 Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit den Mutationen aus Mutante-1**

Die beiden Arginine an Position 186 und 239 verankern das Peptid in der Oberflächen-Spalte zwischen Faltblatt 1 und der Helix.

Sowohl Arginin 186 als auch Arginin 239 ragen aus der Protein-Oberfläche hervor, so dass eine Verankerung des Ziel-Peptids an diesen beiden Aminosäuren möglich wäre. Dabei scheint weniger die Einbringung der positiven Ladung als die Größe der Seitenkette eine entscheidende Rolle zu spielen. So können die überwiegend hydrophilen Aminosäuren des Peptids durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen mit den Amino-Gruppen der Arginine wechselwirken. Dies betrifft insbesondere das N-terminale Asparagin<sup>CCR5</sup> 13 sowie die beiden C-terminalen Aminosäuren Threonin<sup>CCR5</sup> 16 und Serin<sup>CCR5</sup> 17. Gleichzeitig befindet sich der mittlere Teil des Peptids in der Oberflächen-Spalte zwischen Faltblatt 1 und der C-terminalen Helix der IRS1-PTB-Domäne. In dieser können die beiden Tyrosine an Position 14 und 15 des CCR5-Rezeptors mit Phenylalanin 221 eine Interaktion eingehen, welche auf einem elektrostatischen Effekt zwischen den  $\pi$ -Elektronen-Systemen der beiden Aminosäuren-Reste zurückzuführen ist [222]. Des Weiteren wird die Positionierung des Peptids durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Isoleucin 223 unterstützt. So würde sich entsprechend dieses Modells der N-Terminus von CCR5<sup>12-18</sup> in der Nähe von Arginin 239 und das C-terminale Ende bei Arginin 186 positionieren.

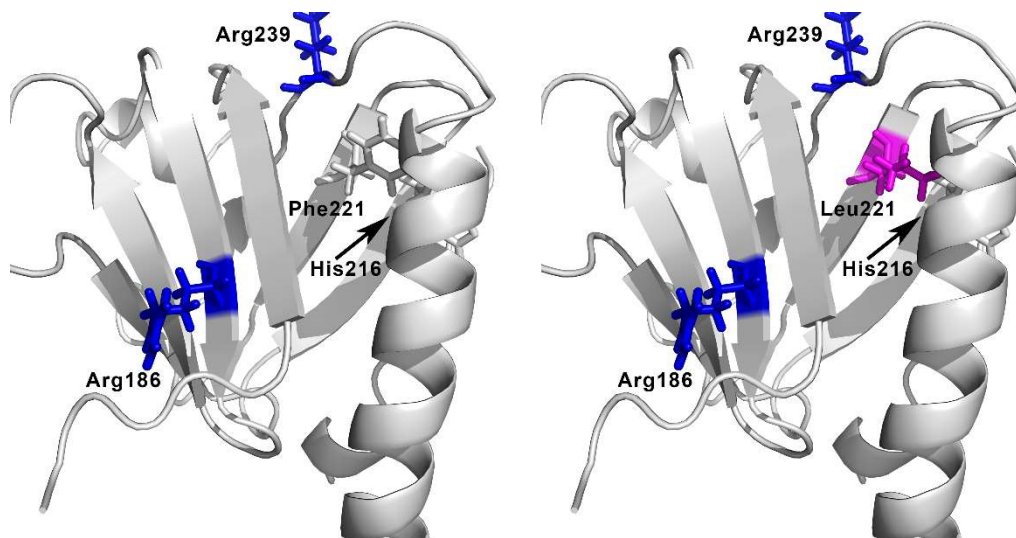
In Bezug auf die mittels NMR-Spektroskopie durch *Huang et al.* [89] untersuchte Struktur des CCR5-N-Terminus bei gp120-Bindung, weist das Bindungsmodell des Peptids an die IRS1-PTB-Domäne einige Ähnlichkeiten auf. So wurde für Tyrosin 14 eine Positionierung in der Oberflächen-Spalte zwischen *bridging sheet* und V3-Schleife beschrieben, während Tyrosin 15

durch seine Interaktion mit Isoleucin 439 aus gp120 diese Konformation stabilisiert. Zudem befindet sich Asparagin 13 in räumlicher Nähe zu Arginin 327 des gp120-Proteins. Außerdem konnte für den entsprechenden Bereich der Aminosäuren des Ziel-Peptids keine Sulfat-spezifische Interaktion mit gp120 nachgewiesen werden. Daher sollte die Vermutung, dass Mutante-1 lediglich Sequenz-spezifisch bindet, aufrechterhalten werden.

#### 4.1.2 Mutante-2 ist in der Lage zwischen IN<sub>s</sub>YYTSA und INYYTSA zu diskriminieren

Mutante-2 entstand durch Erweiterung der Arginin-Mutationen um eine Leucin-Mutation innerhalb der Oberflächen-Spalte zwischen Faltblatt 1 und der Helix. Dabei ging diese Kombination aus Mutationen lediglich aus dem Ribosomen-Display der sulfatierten Peptid-Säule hervor (Tabelle 3.3). Dementsprechend zeigte sich bei der Bestimmung der Bindungs-Affinität eine deutliche Differenzierung zwischen der Bindung des sulfatierten und des nicht-sulfatierten Ziel-Peptids (Abbildung 3.17). Dies äußerte sich in einer 9-mal besseren Bindungs-Konstante der sulfatierten Peptid-Variante, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei Mutante-2 um einen Sulfat-spezifischen Binder handelt.

Im Unterschied zu Mutante-1 fehlt dieser Mutante das für eine Interaktion mit den Tyrosinen 14 und 15 des CCR5-Rezeptors verantwortliche Phenylalanin 221 (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2 Vergleich der Aminosäure-Position 221 in Mutante-1 und -2**

Dargestellt ist die Struktur der IRS1-PTB-Domäne mit Blick auf die Oberflächen-Spalte zwischen Faltblatt 1 und der Helix. Die linke Struktur enthält die Aminosäuren von Mutante-1, wobei die beiden Arginin-Mutationen in blau hervorgehoben sind. Zudem befindet sich ein Phenylalanin an Position 221. In der rechten Struktur ist die in Mutante-2 ergänzte Mutation zu Leucin 221 in pink hervorgehoben. Diese ermöglicht den Kontakt zwischen dem sulfatierten Tyrosin im Ziel-Peptid und dem sich unterhalb der Helix befindenden Histidin 216.

So kann eine Interaktion des mittleren Peptid-Bereichs mit dem Inneren der Oberflächen-Spalte und damit die modellhaft beschriebene Positionierung des Ziel-Peptids lediglich über die hydrophoben Wechselwirkungen mit Isoleucin 223 realisiert werden. Dies reicht aber offensichtlich für das Y-Peptid nicht aus um mit der entsprechenden Affinität zu binden. Dagegen ergibt sich für die sulfatierte Peptid-Variante aufgrund der Entfernung des aromatischen Rings an Position 221 eine neue Interaktions-Möglichkeit. So kann die negativ geladenene Sulfat-Gruppe

mithilfe einer ionischen Bindung in Kontakt zum positiv geladenen Histidin 216 treten. Dieses befindet sich in Faltblatt 5 und ist unterhalb der Helix auf Höhe des mutierten Leucin 221 positioniert. Dementsprechend wird das Ziel-Peptid bei vorliegender Tyrosin-Sulfatierung durch Ausbildung einer Salzbrücke in die Oberflächenspalte gezogen.

Auch *Huang et al.* [89] beschreiben diese Ausbildung von Salzbrücken zwischen den positiv geladenen Aminosäuren des gp120-Proteins und den sulfatierten Tyrosinen im CCR5-N-Terminus. So bildet insbesondere Arginin 327 des Hüllproteins eine ionische Wechselwirkung mit Sulfo-Tyrosin 10 des Corezeptors aus. *Veldkamp et al.* [223] konnten zudem nachweisen, dass die Interaktion der Chemokin-Rezeptoren im Allgemeinen auf die Bildung einer Salzbrücke zwischen dem jeweiligen Liganden und ihren sulfatierten Tyrosinen zurückzuführen ist.

Somit befähigt die in Form der Leucin-Mutation durchgeführte Beseitigung der sterischen Hinderung durch Phenylalanin 221 ausschließlich die sulfatierte Variante des Ziel-Peptids zu einer Bindung an Mutante-2. Diese Bevorzugung wird allerdings hinfällig, wenn wie im Fall von Mutante-3 das mit Tyrosin<sup>CCR5</sup> 15 interagierende Leucin 223 mutiert wird (Abbildung 3.18). Diesbezüglich zeigt sich, dass eine Zusammenfassung mehrerer detektierter Mutationen nicht zwangsläufig eine Verbesserung der Bindungs-Affinität mit sich bringt.

## 4.2 Die Wahl von *Scaffold*, Ziel-Peptid und Display-Methode

---

Mit dem Hintergrund, die Randbedingungen für die Identifikation von Bindern des N-terminalen CCR5-Rezeptors zu optimieren, wurden sowohl für *Scaffold* und Ziel-Peptid als auch für die Display-Methode Alternativen vorgeschlagen. Insbesondere im Falle des Designs und der Entwicklung der Protein-Bibliothek sowie bei der Erzeugung Display-fähiger Konstrukte wurden diese Vorschläge auch bereits in Form von Vorversuchen in die Tat umgesetzt.

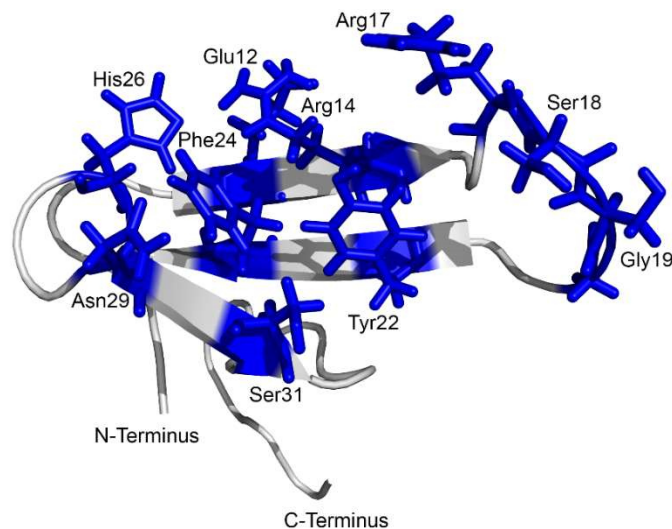
### 4.2.1 Die WW-Domäne von hPin1 als Alternative zur IRS1-PTB-Domäne

Die Tatsache, dass keiner der im Ribosomen-Display selektierten Binder eine Mutation an den ausgewählten Mutations-Positionen aufwies, zeigt, dass es nicht möglich ist aus einem Phosphat-Binder einen Sulfat-Binder zu generieren (Abbildung 3.8). Vielmehr wird der Bereich einer möglichen Bindungstasche unnötig eingegrenzt und so das Potential des Proteins nicht vollständig ausgeschöpft. Daher sollte ein alternatives *Scaffold* trotz großer Mutations-Fläche möglichst klein sein und eine hohe Stabilität aufweisen. So verwendeten *Patel et al.* [224] zur Identifikation eines Binders für den VEGF-Rezeptor eine kombinatorische Protein-Bibliothek auf Basis der WW-Domäne von hPin1.

WW-Domänen sind kleine Peptid-Domänen mit etwa 40 Aminosäuren, die intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln [225]. Dabei ist ihr Name auf ein Paar von konservierten Tryptophanen zurückzuführen, welche für die Bildung der aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehenden Tertiärstruktur essentiell sind. Zudem sind 12 weitere konservierte Aminosäuren für

die strukturelle Integrität und die Liganden-Bindung erforderlich, wobei insbesondere der hydrophobe Kern aufrecht erhalten werden sollte [226,227]. Zur zusätzlichen Erhöhung der Stabilität der Domäne, konnte durch *Jäger et al.* [228,229] außerdem gezeigt werden, dass sowohl die Insertion eines weiteren Tryptophans an Position 15 als auch die Verkürzung der *Loop*-Region einen positiven Effekt auf die Schmelztemperatur der Struktur besitzen.

In Anlehnung an *Patel et al.* [224] wurden die verbleibenden Aminosäuren auf der konkaven Protein-Oberfläche als Mutations-Positionen vorgeschlagen (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3 Die WW-Domäne von hPin1 als Scaffold**

Dargestellt ist die Struktur der hPin1-WW-Domäne mit ihren drei antiparallelen Faltblättern. Die ausgewählten Aminosäuren befinden sich in Faltblatt 1 (Glu12, Arg14), im *Loop* (Arg17, Ser18, Gly 19), in Faltblatt 2 (Tyr22, Phe24), in der Schleife zu Faltblatt 3 (His26) und in Faltblatt 3 selbst (Asn29, Ser31).

Damit wurden 10 der insgesamt 38 Aminosäuren mutiert und die Übertragung dieser Mutationen auf DNA-Ebene mithilfe randomisierter Primer realisiert. Zudem konnte die Bibliothek bereits amplifiziert und ihre Diversität nachgewiesen werden (Anhang D).

#### 4.2.2 Das Ziel-Peptid CCR5<sup>9-18</sup> als Alternative zum Ziel-Peptid CCR5<sup>12-18</sup>

Das in dieser Arbeit eingesetzte Ziel-Peptid CCR5<sup>12-18</sup> enthielt mit Tyrosin 14 nur eine der für die virale Bindung erforderlichen Sulfatierungs-Stellen. Deren Auswahl ging auf *Seibert et al.* [87] zurück, welche sich mit der zeitlichen Abfolge der Tyrosin-Sulfatierungen in CCR5-analogen Peptiden beschäftigten. Dabei konnten sie ein Modifikations-Muster identifizieren, nach welchem die Sulfatierung von Tyrosin 14 denjenigen von Tyrosin 10 und Tyrosin 3 voraus geht.

*Cormier et al.* [88] untersuchten die Rolle der Tyrosin-Sulfatierungen anhand von CCR5<sup>2-18</sup>-Peptiden mit in unterschiedlicher Kombination vorliegenden modifizierten Tyrosinen, indem sie ihre Fähigkeit zur Inhibition löslicher gp120/CD4-Komplexe bestimmten. So konnten sie zunächst nachweisen, dass im Minimum zwei sulfatierte Tyrosine, vorliegend an Position 10 und 14, für eine erfolgreiche Inhibition notwendig waren. Zudem genügte es nicht, diese in einem CCR5<sup>10-14</sup>-Peptid zusammenzufassen, da dieses kurze Peptid keinen inhibierenden Effekt zeigte.

Schließlich konnten *Huang et al.* [89] die Rolle von Tyrosin 10 und Tyrosin 14 während der gp120-Bindung in struktureller Hinsicht aufschlüsseln. So wird letzteres komplett von *bridging sheet* und V3-Schleife eingeschlossen, während mithilfe von Tyrosin 10 eine Salzbrücke zu Arginin 327 ausgebaut und damit eine Verbindung zum Kern von gp120 hergestellt wird.

Dementsprechend sollte neben Tyrosin 14 auch Tyrosin 10 in der Sequenz eines repräsentativen Peptids aus dem N-terminalen CCR5-Rezeptor berücksichtigt werden. Somit wird CCR5<sup>9-18</sup> als optimiertes Ziel-Peptid vorgeschlagen.

#### 4.2.3 Das DNA-basierte CIS-Display als Alternative zum Ribosomen-Display

Das zur Selektion der bindenden Mutanten verwendete Ribosomen-Display basiert auf der Verknüpfung des exprimierten Proteins mit seiner zugehörigen RNA [194,230–233]. Somit ist ein zusätzlicher Reverse-Transkriptase-Schritt erforderlich um die selektierten Mutanten zu identifizieren. Zur Umgehung dieses Umwegs konnten *Odegrip et al.* [234] ein DNA-basiertes Display-System entwickeln, welches sich die sogenannte CIS-Aktivität des RepA-Proteins zunutze macht und daher als CIS-Display bezeichnet wird.

Diese CIS-Aktivität wird von einer Gruppe bakterieller Plasmid-DNA-Replikation-Initiation-Proteine aufgewiesen, zu welchen beispielsweise das RepA-Protein des R1-Plasmids gehört [235,236]. Die Replikation des R1-Plasmids wird durch die Bindung von RepA an den Replikations-Ursprung (*ori*) eingeleitet, wobei sich zwischen der für RepA-codierenden DNA-Sequenz und dem *ori* ein sogenanntes CIS-Element befindet, welches die RNA-Polymerase des Wirts zum Anhalten bringt. Dadurch kann das translatierte RepA-Protein an das CIS-Element binden und wird von diesem an den angrenzenden *ori* weitergeleitet [237,238]. Somit besitzt das RepA-Protein die Fähigkeit exklusiv an die DNA-Sequenz zu binden, von der es exprimiert wurde. Wird nun eine Protein-Bibliothek N-terminal zu RepA kloniert, kann eine direkte Verknüpfung der Proteine mit ihrer zugehörigen DNA realisiert werden (Abbildung 4.4, nach [234]).

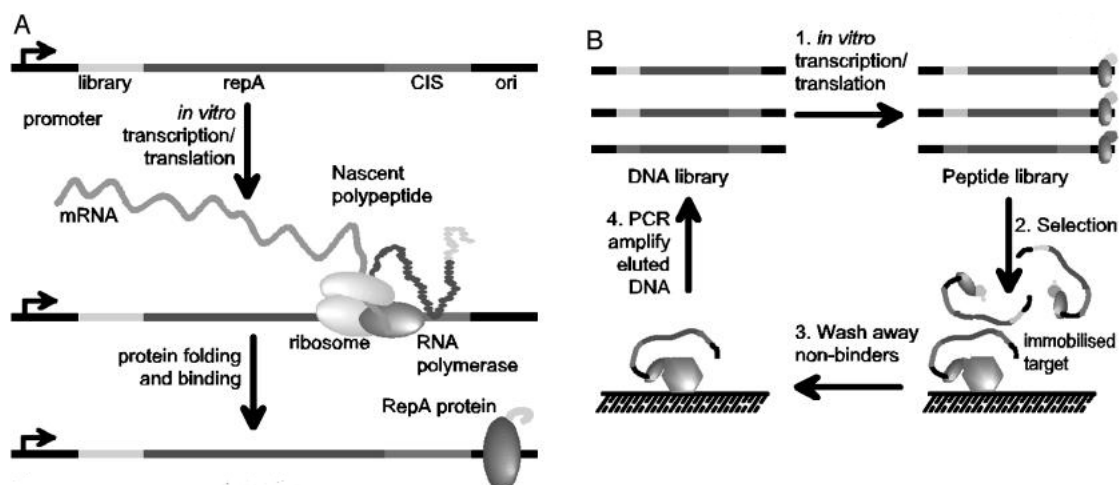


Abbildung 4.4 Prinzip des CIS-Displays [234]

A zeigt die Konstruktion der Protein-Bibliothek. Dabei wird diese an das RepA-Gen gekoppelt, welches die Fähigkeit besitzt an seinen eigenen Replikationsursprung zu binden. Dadurch kann das exprimierte Bibliotheks-Protein direkt mit seiner codierenden DNA verknüpft werden. Zur Auswahl bindender Mutanten werden die Mutanten, wie in B gezeigt, durch immobilisierte Ziel-Proteine selektiert und die zugehörige DNA durch eine PCR amplifiziert.



Dazu wird die für die Protein-Bibliothek-codierende *Template*-DNA mit RepA ligiert und die gemeinsame Transkription durch den vorgeschalteten Promotor eingeleitet. Dieser pausiert sobald die RNA-Polymerase das CIS-Element erreicht, wodurch letztendlich die Bindung des RepA-Fusionsproteins an die zugehörige DNA bedingt wird. In diesem Zusammenhang wurde bereits für die Protein-Bibliothek auf Basis der WW-Domäne das erforderliche Konstrukt durch Ligation mit RepA erzeugt (Anhang D).

Die daran anschließende Selektion bindender Mutanten verläuft beim CIS-Display in ähnlicher Form wie beim Ribosomen-Display, jedoch entfällt naturgemäß der Reverse-Transkriptionsschritt. Nach Inkubation der immobilisierten Liganden mit den Bestandteilen der Protein-Bibliothek wird die verknüpfte DNA eluiert und direkt amplifiziert. Anschließend kann sie für weitere Selektions-Zyklen verwendet oder zur Identifikation der selektierten Binder sequenziert werden.

## II Charakterisierung von Histatin1

Als zweiter Aspekt dieser Arbeit wurde das humane Speichel-Peptid Histatin1 strukturell und funktionell charakterisiert. Auch dieses ist im Hinblick auf die Sulfatierung von Tyrosinen interessant, da bereits verschiedene sulfatierte Histatin1-Derivate in den Speicheldrüsen identifiziert werden konnten.

Ein Großteil der bisherigen Arbeiten an Histatinen beschäftigt sich mit den Produkten des HTN3-Gens, Histatin3 und -5. Diese sind bis auf den nicht-funktionellen C-Terminus homolog, so dass eine Vielzahl der Studien sich auf die Untersuchung von Histatin5 beschränkt. So wurde auch dessen Struktur in Lösung bereits ausgiebig untersucht. Da dagegen die Struktur von Histatin1 bis heute nicht bekannt ist, war es ein Ziel dieser Arbeit den Zustand in hydrophiler Umgebung zu charakterisieren.

Des Weiteren sind für Histatin1 sowohl eine antimikrobielle Aktivität als auch Wundheilungseigenschaften bekannt. Allerdings wurde erstere für Histatin1 spezifisch nur auf dessen N-terminalen Bereich mit Aminosäure 1 bis 24 zurückgeführt. Für Histatin5 dagegen konnte mit dem Peptid P113 bereits eine minimal aktive Domäne gefunden werden. Im Zuge dieser Arbeit sollte diese auf die Sequenz von Histatin1 übertragen und auf ihre antifungale Aktivität untersucht werden. Bezüglich der Wundheilungseigenschaften von Histatin1 konnte schon in vorhergehenden Arbeiten der verantwortliche Peptidabschnitt identifiziert werden. Dieser enthält zwei der vier optional sulfatierten Tyrosine im C-terminalen Bereich. Da bisher noch keine Studien zur funktionellen Wirkung dieser Sulfatierungen bekannt sind, sollte in dieser Arbeit ein möglicher Einfluss der Tyrosin-Sulfatierung auf die Wundheilungseigenschaften charakterisiert werden.

Zur Einordnung der generierten strukturellen sowie funktionellen Ergebnisse kann auf die Vielzahl an Daten zur Charakterisierung von Histatin5 zurückgegriffen werden. Dies wird durch die hohe Sequenz-Homologie zu Histatin1 gerechtfertigt (Abbildung 4.5, modifiziert nach [136]).





**Abbildung 4.5 Alignment von Histatin1 und Histatin5, modifiziert nach [136]**

Dargestellt sind die Sequenzen von Histatin1 und Histatin5 mit maximaler Homologie. Abweichungen in den Aminosäuren sind in blau gekennzeichnet. In pink bzw. grün sind die beiden ausgewählten Fragmente von Histatin1 hervorgehoben. Dabei entspricht N-Term.Hist1 dem Peptid P-113 aus Histatin5 [136].

Dabei wurde in dieser Arbeit sowohl Histatin1 in voller Länge als auch je ein ausgewähltes N-terminales (pink) bzw. C-terminales Fragment (grün) eingesetzt. Das verwendete *Full-length*-Peptid war sowohl synthetischen als auch rekombinanten Ursprungs und wies in beiden Fällen ein Fehlen der Phosphorylierung an Serin 2 auf. Dabei sollten jedoch keine negativen Effekte im Vergleich mit dem nativen Peptid auftreten, da dies insbesondere für die rekombinante Variante bereits ausgeschlossen wurde [170]. Für die Herstellung des rekombinanten Histatin1 wurde die Expression in *E. coli* gewählt. Damit konnte das Peptid nicht nur in ausreichenden Mengen produziert, sondern auch mit dem Isotop  $^{15}\text{N}$  angereichert werden. Nach Etablierung der anschließenden Reinigung stand es dann für eine Vielzahl von Experimenten zu dessen Charakterisierung zur Verfügung.

## 4.1 Die Struktur von Histatin1 in hydrophiler Umgebung

Im Mittelpunkt der strukturellen Charakterisierung von Histatin1 stand zunächst einmal die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur in wässriger Lösung. Dabei wurden zwei konformere Formen des Peptids identifiziert und in der Folge analysiert.

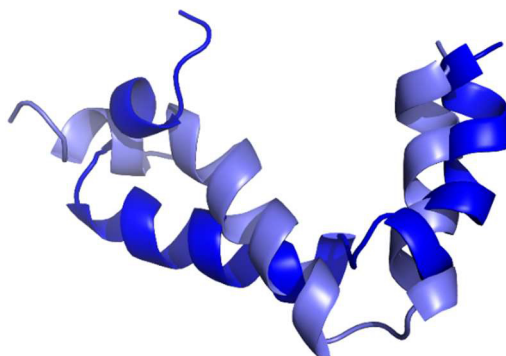
### 4.1.1 Histatin1 ist in hydrophiler Umgebung ein monomeres $\alpha$ -helikales Peptid

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde lediglich die Struktur von Histatin3 bzw. Histatin5 aufgelöst [105–107]. Dabei konnte zumindest in Speichel-ähnlicher wässriger Lösung keine definierte Sekundärstruktur ausgemacht werden. In Dimethylsulfoxid und wässrigem Trifluoroethanol dagegen wurde eine helikale Konformation nachgewiesen. Diese Ergebnisse werden auch durch verschiedene CD-spektroskopische Messungen mit Histatin5 in voller Länge sowie einzelnen Peptid-Fragmenten unterstützt [108,134,239,240].

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Sekundärstrukturvorhersagen für Histatin1 (Abbildung 3.23) berechneten einen Anteil von 53-76 % an unstrukturierten Bereichen. Als sekundäre Elemente wurde überwiegend  $\beta$ -Faltblatt vorhergesagt. Auch wenn Peptide dieser Größe in hydrophiler Umgebung eher unstrukturiert vorliegen, kann eine genauere Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie Aufschlüsse über Sekundärstruktur-ausbildende Bereiche geben. So dominieren in den 10 besten berechneten Strukturen von Histatin1 (Abbildung 3.25) entgegen der Vorhersage drei  $\alpha$ -Helices (Helix 1 [AS 4-8], Helix 2 [AS 11-23], Helix 3 [AS 26-38]). Damit

liegt der Anteil an helikalen und damit strukturierten Bereichen bei 84,2 %. Während der RMSD-Wert für das Peptidrückgrat mit 4 Å recht hoch ist, weisen die berechneten Werte für die einzelnen Helices mit rund 1 Å auf eine gute Definition dieser Elemente hin. Dies unterstreicht auch die Analyse der  $\alpha$ - $^1\text{H}$ -Verschiebungen nach *Wishart et al.* [241,242], welche insbesondere für Helix 3 eine eindeutige Verschiebung in den höheren ppm-Bereich und damit zum helikalen Strukturelement zeigt. Für Helix 1 bzw. Helix 2 ergibt sich mit dieser Methode eine von Glutamat 4 bis Glutamat 23 durchgehende helikale Konformation. Diese ist aber aufgrund der außergewöhnlich niedrigen ppm-Werte der Histidine in diesem Bereich dementsprechend schwächer definiert.

Bezogen auf die dreidimensionale Struktur deutet die Signalverteilung im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Histatin1 auf ein wenig strukturiertes Peptid hin. Zudem liegt der Anteil an den zur Strukturrechnung verwendeten mittelweiten sowie weitreichenden NOE-Signalen bei nur 10 %. Dadurch ist die räumliche Anordnung der drei Helices zueinander nicht eindeutig definiert, was sich wiederum in dem schlechten RMSD-Wert des Peptidrückgrats äußert. Grundsätzlich sind dabei im Struktur-Ensemble von Histatin1 zwei unterschiedliche Modelle der Helix-Anordnung zu finden (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6 Grenzstrukturen von Histatin1**

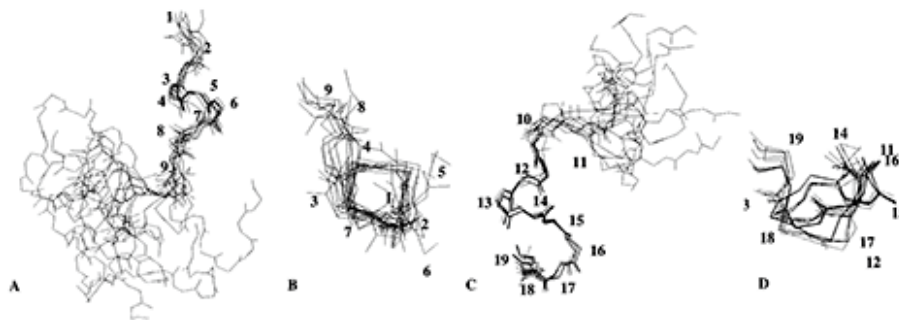
Dargestellt sind die beiden Strukturen mit der größten Ausprägung der jeweiligen Helix-Anordnung. Entweder besteht der räumliche Kontakt zwischen Helix 1 und Helix 2 (blau) oder zwischen Helix 2 und Helix 3 (violett).

So befinden sich entweder Helix 1 und Helix 2 (blau) oder Helix 2 und Helix 3 (violett) in räumlicher Nähe. Anhand der NOEs in diesem Bereich kann das zweite Modell ausschließlich auf den naheliegenden Kontakt von Prolin 25 mit Tyrosin 27 in der C-terminalen Helix zurückgeführt werden. Dagegen ist der Kontakt von Helix 1 und Helix 2 in der räumlichen Nähe von Histidin 7 zu Glutamat 16 begründet. Insgesamt kann also von einer hohen Flexibilität des überwiegend helikalen Peptids ausgegangen werden.

Als erste strukturelle Arbeit an Histatinen untersuchten *Raj et al.* [134] synthetisches Histatin5 sowie die drei Fragmente C16 (AS 9-24), N16 (AS 1-16) und C14 (11-24) mittels CD-Spektroskopie. In nicht-wässrigem Lösungsmittel wie Trifluoroethanol und Methanol zeigten diese  $\alpha$ -helikale Strukturen. Dagegen wurde in Wasser und Phosphatpuffer *random coil*

favorisiert. Dabei wurde propagiert, dass die schwachen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Peptids in wässriger Umgebung durch starke Bindungen zu den Wassermolekülen ersetzt werden und sich darin die strukturelle Flexibilität des Peptids erklärt. *Brewer et al.* [107] verwendeten neben CD-Experimenten auch NMR-Spektroskopie um Hinweise zur Sekundärstruktur von Histatin3 und Histatin5 zu erhalten. Ersteres präsentierte sich in Wasser im Grunde unstrukturiert und nahm erst in einer äquivalenten Lösung von Wasser und Dimethylsulfoxid eine geordnete Struktur an. Im Vergleich mit Histatin5, welches zumindest in Dimethylsulfoxid und wässrigem Trifluoroethanol steigende helikale Anteile aufwies, zeigte Histatin3 aber eine deutlich schwächere Neigung zur Ausbildung helikaler Strukturen.

Die erste Struktur eines Histatins wurde von *Raj et al.* [105] mit synthetischem Histatin5 in wässriger sowie in Dimethylsulfoxid-Lösung aufgelöst. Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass das Peptid in Wasser in einem pH-Bereich von 3.8 bis 8.3 unstrukturiert bleibt. Dagegen bevorzugt es im polar aprotischen Lösungsmittel eine weitgehend  $\alpha$ -helikale Konformation, welche durch 19 intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. *Melino et al.* [108] konnten wenig später die Struktur von Histatin5 in 90 % TFE auflösen (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7 Strukturen von Histatin5 [108]**

**A und B** zeigen eine Überlagerung der gerechneten Konformationen an Aminosäure 2 bis 9. In **C und D** ist eine Überlagerung an Aminosäure 10 bis 19 dargestellt.

Diese Struktur beinhaltet je eine gut definierte  $\alpha$ -Helix von Serin 2 bis Glycin 9 sowie von Histidin 11 bis Histidin 19. Im Vergleich mit der in Dimethylsulfoxid determinierten Struktur ist dabei eine eindeutige Unterbrechung der Helix zwischen Glycin 9 und Histidin 11 zu erkennen. Die Strukturierungs-Kapazität in wässrigem Trifluoroethanol liegt dabei zwischen der in Wasser und der in Dimethylsulfoxid. Da das gewählte Lösungsmittelgemisch eine Membran-ähnliche Umgebung imitieren sollte, wurde außerdem mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen, dass Histatin5 unter diesen Bedingungen als Monomer vorliegt. Eine mögliche Multimerisierung von Histatin5 wurde auch von *Den Hertog et al.* [243] mithilfe eines Liposomen-Modells untersucht. Das Peptid zeigte aber nur ein kleines bis kein Bestreben zur Ausbildung transmembraner Peptid-Multimer-Poren.

Für Histatin1 weisen die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zur Molekülgröße zumindest in hydrophiler Umgebung ebenfalls nicht auf eine Multimerisierung hin. Mithilfe der durchgeführten analytischen Größenausschlusschromatographie mit variierender Peptidkonzentration konnte das monomere Molekulargewicht mit einer maximalen Abweichung von 1 kDa ermittelt werden.

Die Größenausschlusschromatographie ist aber nicht nur abhängig vom Molekulargewicht, sondern auch von der Molekülstruktur und dem hydrodynamischen Radius eines Moleküls [244]. Dabei wird von dem Idealfall eines strukturierten globulären Proteins ausgegangen, was auf Histatin1 aufgrund seiner Flexibilität nicht zutrifft. Unter Berücksichtigung der zusätzlich möglichen, ungewollten Interaktion mit der Säulenmatrix kann trotz der errechneten Abweichung von einem Histatin1-Monomer ausgegangen werden. Die Ergebnisse der Relaxationsmessungen und die daraus resultierende berechnete Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  zeigen ebenfalls ein als Monomer vorliegendes Histatin1. Ein Vergleich mit der Rotationskorrelationszeit anderer amphipatischer  $\alpha$ -helikaler antimikrobieller Peptide ist leider nicht möglich, da für die Mehrheit der Studien die Schwierigkeiten der Herstellung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Peptid umgangen wurden. Diese Isotopen-Markierung ist für die Messungen zur Relaxation aber zwingend erforderlich.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten und des Vergleichs mit den veröffentlichten Informationen zu anderen Histatinen kann geschlussfolgert werden, dass insbesondere zwischen Histatin1 und Histatin5 strukturelle Übereinstimmungen bestehen. Zunächst liegen beide Peptide als Monomer vor und bilden helikale Sekundärstrukturen aus. Ferner beschreibt *Melino et al.* für Histatin5 eine Unterbrechung der Helix-Struktur durch Aminosäure 9 bis 11, was ebenso auf den Bereich zwischen Helix 1 und Helix 2 in der Struktur von Histatin1 übertragen werden kann. Für die an das Prolin-Gelenk anschließende C-terminale Helix 3 kann leider keine Äquivalenz gefunden werden, da für diesen Bereich keine homologen Histatine existieren. Außerdem sind die Helices von Histatin1 schon in hydrophiler Umgebung in schwacher Ausprägung vorhanden, während Histatin5 für die Formation von  $\alpha$ -helikalen Strukturen die Interaktion mit Membran-ähnlichen Systemen zu benötigen scheint.

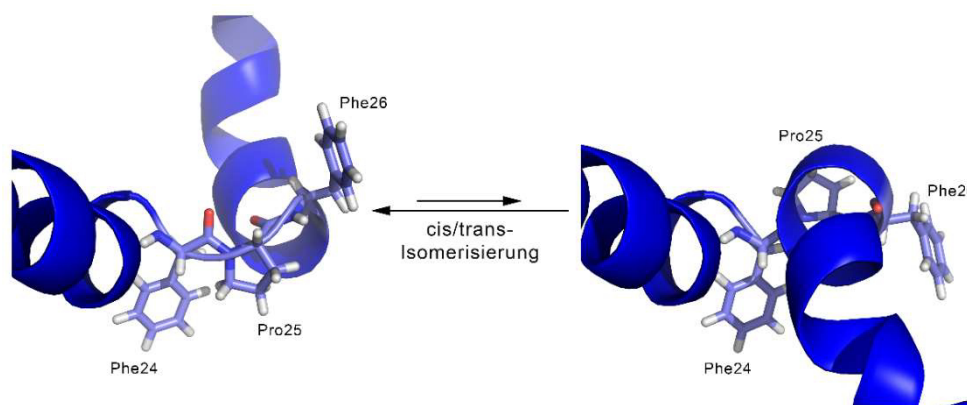
**4.1.2 Histatin1 liegt in wässriger Lösung in einem *cis*- zu *trans*-Verhältnis von 1:2 vor**  
 Histatin1 ist unter den drei Haupt-Histatinen das einzige, das die Aminosäure Prolin enthält. Diese befindet sich an Position 25 und fällt damit in die Sequenz von Glutamin 23 bis Glycin 31, welche weder in Histatin3 noch in Histatin5 zu finden ist [100]. Während die Peptidbindungen in Proteinen aus sterischen Gründen eine *trans*-Konformation bevorzugen, begünstigt die Anwesenheit eines Prolins das Auftreten des *cis*-Isomers. Dabei ist diese *cis/trans*-Isomerisierung auf der NMR-Skala ein langsames Ereignis, so dass separate Signale für *cis*- und *trans*-Isomere aufgelöst werden [202,245,246].

Die in dieser Arbeit aufgenommenen zweidimensionalen Spektren zur Strukturaufklärung von Histatin1 zeigen für insgesamt 12 der 38 Aminosäuren neben *trans*- auch deutliche *cis*-Signale. Dabei sind insbesondere die jeweils zusammengehörigen Spinnssysteme der acht zu Prolin C-terminalen Aminosäuren klar zu identifizieren (Abbildung 3.27.). Dagegen liegen die entsprechenden Paare der drei N-terminalen Aminosäuren bezüglich der  $H_N$ -Achse weit auseinander. Zudem scheint der *cis*-Anteil deutlich schlechter definiert. Für Prolin selbst sind als Kopplung der beiden  $\delta$ -H-Protonen zwei eindeutige Signal-Populationen identifizierbar

(Abbildung 3.26). Um diese dem entsprechenden Konformer zuzuordnen, wurde nach den chemischen Verschiebungen sowie der zugehörigen Zuordnung einer vergleichbaren und unter vergleichbaren Bedingungen gemessenen Peptidsequenz recherchiert. So beschäftigten sich *Kern et al.* [217] mit der Kinetik der Cyclophylin-katalysierten Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung und verwendeten dabei das Substrat N-succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-(4-)nitroanilid. Durch Vergleich der relativen  $^1\text{H}$ -Verschiebungen mit denen von Phenylalanin 24, Prolin 25 und Phenylalanin 26 aus Histatin1 konnte den Signalen das entsprechende Isomer zugeordnet werden.

Die Isomerisierung von X-Pro-Peptidbindungen erhält ihre Relevanz durch ihre Funktion als Geschwindigkeit-bestimmender Schritt in der Denaturierung und Renaturierung von Proteinen [247]. *Grathwohl et al.* [246] zeigten mithilfe von NMR-Studien, dass für unstrukturierte Polypeptidketten ein *cis*- zu *trans*-Verhältnis von 1:10 zu erwarten ist. Dabei geht eine Veränderung dieses Gleichgewichtszustands mit einer Minimierung der Gesamt-Konformationsenergie des Moleküls einher. *Anteunis et al.* [216] verwendeten verschiedene Tripeptide um den Einfluss der Prolin-nachfolgenden Aminosäure auf die Peptid-Konformation zu untersuchen. Dabei stieg der *cis*-Anteil für das Peptid mit der Sequenz Gly-Pro-Phe auf 27,5 %. Als Grund dafür wurden eine elektrostatische Interaktion der  $\pi$ -Elektronen des Phenylalanins mit der Gly-Pro-Peptidbindung und eine damit verbundene Destabilisierung des *trans*-Konformers postuliert. Dieser Effekt des aromatischen Rings wurde auch für die Prolin-vorausgehende Aminosäure beobachtet. So ermittelten *Grathwohl et al.* [248] die Isomerisierungsraten sowie das *cis/trans*-Verhältnis der X-Pro-Peptidbindung verschiedener Oligopeptide. Dabei lag das Peptid mit der Sequenz Phe-Pro-Ala zu einem Anteil von 34 % als *cis*-Isomer vor. Das für die Zuordnung der Prolin-Signale verwendete Referenzpeptid mit zwei zu Prolin-benachbarten Phenylalaninen zeigte dagegen ein *cis/trans*-Verhältnis von 26:74.

Für Histatin1 betrug der in dieser Arbeit mithilfe des Vergleichs von Signalintensitäten ermittelte *cis*-Anteil durchschnittlich 33 %. Dies entspricht exakt einem *cis*- zu *trans*-Verhältnis von 1:2. Analog zur elektrostatischen Interaktion der Seitenkette des Phenylalanins trägt hier das Tyrosin an Position 27 mit seinem aromatischen Ring zusätzlich zu einer Destabilisierung der *trans*-Konformation bei (Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8 Modell der *cis/trans*-Isomerisierung von Histatin1**

Abgebildet ist modellhaft die Isomerisierung der X-Pro-Peptidbindung in Histatin1 von *trans* (links) zu *cis* (rechts). Dabei wurde die Bewegung der Helix mithilfe des Programms *Pymol* realisiert. Anhand dieses Modells lässt sich eine Zunahme des Kontakts von Helix 2 und Helix 3 vermuten.

Aufgrund der Vielzahl an *cis/trans*-Paaren der Prolin-nachfolgenden Aminosäuren kann dabei von einer Bewegung der gesamten C-terminalen Helix ausgegangen werden. Durch diese Bewegung scheint der Kontakt von Helix 2 und Helix 3 begünstigt, was ebenfalls als Grund für die Stabilisierung des *cis*-Isomers angegeben werden kann. In funktioneller Hinsicht betrifft die Konformationsänderung vor allem den für die Wundheilung verantwortlichen Bereich des Peptids. Da allerdings auch für Histatin3 Wundheilungs-Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, scheint die Fähigkeit zur *cis/trans*-Isomerisierung nicht unmittelbar erforderlich zu sein.

## 4.2 Die antifungale Aktivität von Histatin1

---

Histatin1 besitzt unter den drei Haupt-Histatinen die geringste antifungale Aktivität und wurde aus diesem Grund in bisherigen Studien zu diesem Thema nur selten beachtet. Daher sollte in dieser Arbeit neben dem Konzentrations-abhängigen Vergleich von rekombinantem und synthetischem Histatin1 auch die Wirkung einer möglicherweise minimal aktiven Domäne untersucht werden. So wurde analog zum Peptid P-113 aus Histatin5 die antifungale Aktivität eines N-terminalen Fragments von Histatin1 analysiert.

### 4.2.1 Die Aktivität von rekombinantem und synthetischem Histatin1 gegen *S. cerevisiae* ist gestaffelt konzentrationsabhängig

Die funktionelle Rolle der Histatine *in vivo* beinhaltet die Eindämmung des Wachstums von *C. albicans*. Dementsprechend beschäftigt sich die Mehrheit der veröffentlichten Studien mit der antifungalen Aktivität der drei Haupt-Histatine gegen diese pathogene Hefe.

Die Aktivität von Histatin1 gegen *C. albicans* wurde zum ersten Mal von Xu *et al.* [136] im Vergleich mit der Wirkung von Histatin3 und -5 untersucht. Dabei zeigte Histatin5 unabhängig von der gewählten Zelllinie und der betrachteten Wachstumsphase die höchste Effektivität. Histatin1 zeigte mit deutlichem Abstand zu Histatin3 die schwächste Aktivität, so dass eine inverse Korrelation zur Molekülgröße propagiert wurde. Zudem wurde in dieser Studie die unterschiedliche antifungale Aktivität in Bezug auf Teleomorphe und Anamorphe von *C. albicans* dargestellt. Dabei lag die erforderliche Histatin1-Konzentration für eine 50 %ige Inhibition der teleomorphen Form bei über 70 µM und damit rund 7-mal so hoch wie bei Histatin5 und Histatin3. Dagegen konnte die anamorphe Form bereits bei etwa 6 µM Histatin1 zu 50 % inhibiert werden, was einer Verdreifachung der zugehörigen Histatin5-Konzentration entsprach. Driscoll *et al.* [170] analysierten anschließend die Wirkung von nativem Histatin1 auf die Anamorphe von *C. albicans* im Vergleich mit der nicht-phosphorylierten synthetischen Variante des Peptids. Dabei wurde die für eine 50 %ige Inhibition erforderliche Histatin1-Konzentration von 6 µM sowohl für das native Peptid als auch für die synthetische Variante bestätigt.

Neben der antifungalen Aktivität der Histatine gegen *C. albicans* konnte *in vitro* auch eine Wirkung von Histatin3 und -5 gegen *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Zudem gelang es Edgerton *et al.* [139] das vermeintlich Histatin5-bindende Protein sowohl aus der Zellmembran

von *C. albicans* als auch von *S. cerevisiae* zu isolieren. Daher wurde in Anbetracht der geringeren Sicherheitsstufe für eine nicht-pathogene Hefe der in dieser Arbeit etablierte Toxizitäts-Assay mit *S. cerevisiae* durchgeführt und dabei eine fehlende Vergleichbarkeit in Kauf genommen.

In der in dieser Arbeit durchgeführten Gegenüberstellung von rekombinantem und synthetischem Histatin1 zeigten beide Peptide dieselbe Fähigkeit zur Inhibition des Hefen-Wachstums (Abbildung 3.39). Dabei konnte ein inhibitorischer Effekt von knapp 45 % bereits oberhalb einer Histatin1-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Zudem zeigte sich für die verwendeten Peptid-Konzentrationen eine gestaffelte Konzentrations-Abhängigkeit nach folgendem Muster: Eine 10-fach geringere Peptid-Konzentration bewirkte eine 3-mal schlechtere Inhibition. Dementsprechend lag der inhibitorische Effekt für Konzentrationen unterhalb von 1  $\mu\text{M}$  Histatin1 nur noch bei rund 5 %. Eine Inhibition des Hefen-Wachstums von 50 % wurde im verwendeten Konzentrations-Bereich nicht erreicht und ist daher für Histatin1-Konzentrationen größer 35  $\mu\text{M}$  zu erwarten. In Anbetracht der Verwendung einer teleomorphen Form von *S. cerevisiae* kann dieser Wert nur mit der erforderlichen Histatin1-Konzentration für Teleomorphe von *C. albicans* bei Xu *et al.* [136] in Verbindung gebracht und diesbezüglich als realistisch eingestuft werden.

#### 4.2.2 Das N-terminale Fragment EKRHHGYRRKFH aus Histatin1 besitzt vollständige antifungale Aktivität

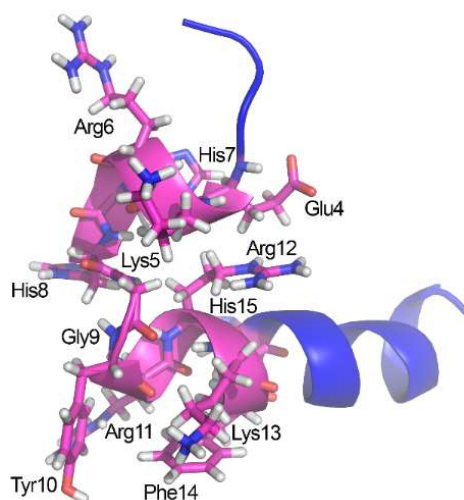
Die antifungale Aktivität der drei Haupt-Histatine wird einer 14 Aminosäuren großen Region im mittleren Bereich von Histatin3 zugeschrieben [130,134,136,137,153,154,249]. Diese Domäne ist in Histatin1, -3 und -5 hoch konserviert und übertrifft mit einer 50 %igen Inhibition bei einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  die Toxizität aller nativen Histatine. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Vervielfachung dieser Domäne innerhalb eines Peptids die antifungale Aktivität proportional zur Anzahl der eingesetzten Domänen erhöht [155].

Ein weiteres antifungal aktives Histatin-Fragment wurde von Rothstein *et al.* [156] in der Sequenz des am stärksten antimikrobiell aktiven Histatin5 entdeckt. Das sogenannte Peptid P-113 umfasst die Aminosäuren 4 bis 15 und weist trotz der deutlich reduzierten Größe auf molarer Basis eine ebenso hohe Aktivität wie Histatin5 selbst auf. Zusätzlich konnte die Effektivität dieses Peptids bereits durch eine klinische Studie zur Behandlung von Zahnfleischentzündungen bestätigt werden [158]. Verbunden mit den geringen Synthesekosten für das, nur 12 Aminosäuren große P-113 ist dieses daher ein exzellenter Kandidat für die Prävention und die Behandlung *Candida*-basierter fungaler Infektionen. Da P-113 mit seiner Sequenz AKRHHGYKRKFH innerhalb der Histatine nicht vollständig konserviert ist, wurde in dieser Arbeit das mit nur zwei veränderten Aminosäuren analoge Fragment EKRHHGYRRKFH in Histatin1 als möglicherweise minimal aktive Domäne ausgewählt. Im Vergleich mit dem rekombinanten sowie dem synthetischen Histatin1 in voller Länge erhält dieses N-terminale Fragment tatsächlich die volle antifungale Aktivität (Abbildung 3.39). Dabei behält das Peptid auch bei der geringsten betrachteten Konzentration noch eine Aktivität von gut 20 %. Eine 50 %ige Inhibition wird bereits bei einer



Peptid-Konzentration zwischen 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  erreicht, so dass das N-terminale Fragment im Vergleich mit Histatin1 selbst sogar eine verbesserte Effektivität besitzt.

In struktureller Hinsicht wurde bereits für das Peptid P-113 die Notwendigkeit einer  $\alpha$ -helikalen Struktur für die antifungale Wirkung diskutiert. Dabei konnte mittels CD-Spektroskopie ein Helix-Anteil von 19-27 % nachgewiesen werden [156]. Dementsprechend besitzt das Peptid einen weniger helikalen Charakter als Histatin5 in voller Länge, was auf die reduzierte Anzahl an potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats oder aber eine mangelnde Detektierbarkeit der helikalen Struktur aufgrund der geringen Peptidgröße zurückzuführen ist. Für das analoge Fragment aus Histatin1 entspricht die zugehörige Region in der Struktur dem Gelenk von Helix 1 und Helix 2 (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9 Struktur der Sequenz EKRHHGYKFH aus Histatin1**

Dargestellt ist der N-Terminus der berechneten Struktur von Histatin1. Das zu P-113 analoge Fragment ist in pink hervorgehoben. Eine  $\alpha$ -helikale Struktur ist allerdings nur zwischen Tyrosin 10 und Histidin 15 zu vermuten.

Ein Erhalt der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur ist für das N-terminale Fragment aufgrund der fehlenden mittelweiten NOEs zwischen den Aminosäuren in Helix 1 nur für den betroffenen Teil von Helix 2 zu vermuten. Dabei weisen die zur Strukturrechnung verwendeten NOEs zwischen Tyrosin 10 und Lysin 13 sowie Arginin 11 und Phenylalanin 14 zumindest zwischen Aminosäure 10 und 14 auf eine induzierte Helix hin. Der geschätzte Helix-Anteil des N-terminalen Fragments von Histatin1 läge somit bei 40 %. Eine Stabilisierung dieser helikalen Struktur könnte durch Hinzunahme von Glutamat 16 ermöglicht werden, da *Ramalingam et al.* [240] für das C16-Fragment aus Histatin5 die Salzbrücke zwischen Arginin 11 und Glutamat 16 als Auslöser der Helix-Bildung identifizieren konnten. Eben diese Verbindung ist anhand der entsprechenden NOEs zwischen diesen Aminosäuren auch in der Struktur von Histatin1 zu finden (Anhang C). Bisher ist jedoch eine Notwendigkeit der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen für die antifungale Aktivität nicht bestätigt. Vielmehr sind die veröffentlichten Arbeiten diesbezüglich



zusammengenommen eher widersprüchlich [96,134,240,250]. In Bezug auf das N-terminale Fragment von Histatin1 wird allerdings eine Helix-Bildung in diesem Bereich in keiner der Arbeiten ausgeschlossen. Zwar zeigten *Situ et al.* [239] mithilfe von Prolin-Mutanten, dass eine Unterbrechung der helikalen Konformation nicht mit einem Verlust der Toxizität einhergeht, jedoch befinden sich diese Mutationen außerhalb der Aminosäuren 4 bis 15. Daher bleibt die Möglichkeit bestehen, dass die zumindest teilweise  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur des Histatin1-Fragments für die antifungale Aktivität benötigt wird.

#### 4.3 Die Wundheilungs-Eigenschaften von Histatin1

---

Die Eigenschaft von Histatin1 als wesentlicher Faktor an der oralen Wundheilung beteiligt zu sein, wurde bereits bis hin zur minimal aktiven Domäne des Peptids erforscht. In dieser Arbeit sollte daher ergänzend die analoge Aktivität von rekombinantem und synthetischem Histatin1 konzentrationsabhängig überprüft werden. Außerdem wurde anhand der minimal aktiven Domäne der mögliche Einfluss einer Tyrosin-Sulfatierung auf die Wundheilungs-Eigenschaften untersucht.

##### 4.3.1 Rekombinantes und synthetisches Histatin1 besitzen analoge Wundheilungs-Eigenschaften

Zunächst wurde die Fähigkeit zur Wundheilung von rekombinantem und synthetischem Histatin1 im Vergleich untersucht. Dabei konnte mithilfe des in dieser Arbeit durchgeführten Wundheilungs-Assays gezeigt werden, dass die Wundheilungs-Eigenschaft für beide Peptide Konzentrationsabhängig einen analogen Verlauf besitzt (Abbildung 3.43).

*Oudhoff et al.* [118] entdeckten die Wundheilungs-Eigenschaften der Histatine durch Analyse von HPLC-Fractionen des menschlichen Speichels. Dabei konnte eine gesteigerte Wundheilung insbesondere für die Fraktion ermittelt werden, welche Histatin1 und sein C-terminales Fragment Histatin2 enthielt. Unter Einsatz von synthetischem Histatin1 in einer Konzentration von etwa 6  $\mu\text{M}$  wurde eine Verbesserung der Wundheilung von gut 20 % erreicht. In der daran anschließenden Studie von *Oudhoff et al.* [119] wurde dieser Wert allerdings bereits revidiert, da sich während des Vergleichs des Peptids in voller Länge und einer zyklisierten Form des C-Terminus von Histatin1 deutlich höhere Werte ergaben. So bewirkte bereits eine Peptid-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Histatin1 eine 25 %ige Steigerung der Wundheilung. Unter Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Peptid lag die Steigerung sogar bei über 50 %. Allerdings wurde hier nur der Wundheilungs-Effekt von Histatin1-Konzentrationen in Zehnerpotenz-Schritten untersucht und so für Werte kleiner als 1  $\mu\text{M}$  keine Aktivität mehr nachgewiesen.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Wundheilungs-Assay mit rekombinantem und synthetischem Histatin1 wurde dagegen der Bereich zwischen 0,625  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  durch stetige Verdopplung der Peptid-Konzentration aufgeschlüsselt. Die ermittelten Werte für 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Histatin1-Konzentration sind dabei mit den von *Oudhoff et al.* veröffentlichten deckungsgleich.

Insgesamt zeigt sich die Wundheilungs-Eigenschaft über den betrachteten Bereich stark Konzentrations-abhängig. Bei der niedrigsten Peptid-Konzentration ist aber immer noch eine Verbesserung der Wundheilung von gut 15 % festzustellen. Daher kann unter Einbeziehung der fehlenden Aktivität bei 0,1  $\mu\text{M}$  davon ausgegangen werden, dass die minimale Histatin1-Konzentration für einen Wundheilungs-Effekt zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 0,625  $\mu\text{M}$  liegt.

#### 4.3.2 Die Wundheilungs-Eigenschaft der minimal aktiven Domäne von Histatin1 steigt bei Tyrosin-Sulfatierung

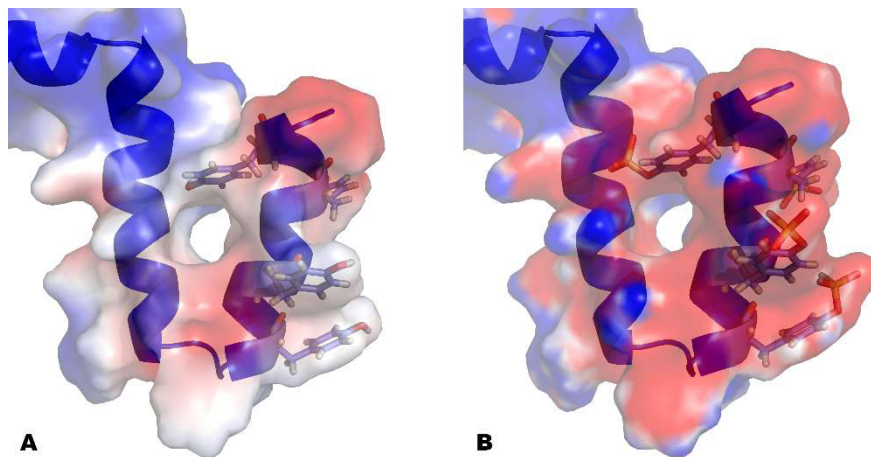
Vorhergehende Arbeiten zur Wundheilungs-Eigenschaft von Histatin1 konnten mithilfe einer schrittweisen N- und C-terminalen Verkürzung des Peptids die für die Aktivität notwendige minimale Domäne identifizieren. Mit der Sequenz SHREFPFYGDYGS (AS 20-32) ist diese im C-Terminus von Histatin1 und dessen C-terminalem Fragment Histatin2 lokalisiert [119]. Damit enthält der für die Wundheilung verantwortliche Bereich von Histatin1 zwei Tyrosine. Ein Effekt durch die mögliche Sulfatierung der beiden auf die Wundheilungs-Eigenschaften wurde bislang noch nicht untersucht.

Wird die Sequenz von Histatin1 bei Sulfinator [251] eingelesen, wird nur Tyrosin 27 als mögliche Sulfatierungsstelle vorgeschlagen. *Cabras et al.* [171] konnten jedoch durch die Massenspektrometrische Detektion verschiedener Histatin1-Derivate nachweisen, dass alle vier im C-Terminus angesammelten Tyrosine als Substrate der Tyrosylprotein-Sulfotransferase infrage kommen. In Übereinstimmung mit der O-Sulfatierung der vier Tyrosine im N-Terminus des CCR5-Rezeptors wurde allerdings propagiert, dass die Sulfatierung von Tyrosin 27 in Histatin1 zur Aktivierung der anderen drei Tyrosine benötigt wird. Dies kann ebenfalls durch das Fehlen dieses Tyrosins in Histatin3 und der nicht vorhandenen Sulfatierung der verbleibenden drei Tyrosine belegt werden. Aus diesem Grund wurde in dem in dieser Arbeit durchgeführten Wundheilungs-Assay die an Tyrosin 27 sulfatierte Variante der minimal aktiven Domäne im Vergleich mit dem nicht sulfatierten Fragment eingesetzt.

Für beide Varianten von Histatin1<sup>20-32</sup> zeigte sich im betrachteten Konzentrationsbereich von 0,625  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  keine Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 3.43). Dabei lagen die in dieser Arbeit generierten Werte für den Wundheilungs-Effekt der minimal aktiven Domäne durchgehend bei 30 % bis 35 % und sind daher mit dem von *Oudhoff et al.* veröffentlichten Zuwachs bei Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  Peptid deckungsgleich. Durch die Sulfatierung an Tyrosin 27 ließ sich eine nochmalige 5- bis 10 %ige Verbesserung der Wundheilungs-Eigenschaften realisieren. Somit lagen die ermittelten Werte des sulfatierten Fragments konstant zwischen 40 % und 45 %. Für beide Peptid-Fragmente sind dementsprechend eine Konzentrationsabhängigkeit und die für eine Aktivität notwendige Minimalkonzentration erst unterhalb von 0,625  $\mu\text{M}$  zu erwarten.

Die Eigenschaft von Histatin1 den Wundheilungs-Prozess zu beschleunigen, ist in der Fähigkeit begründet, ERK1/2 mithilfe eines G-Protein gekoppelten Rezeptors zu aktivieren [118]. Während der schrittweisen Verkürzung von Histatin1 wurde gezeigt, dass eine N-terminale Verlängerung

der minimal aktiven Domäne um Histidin 19 und Histidin 18 eine abnehmende Aktivität zur Folge hat. Als Grund dafür wurde eine geringere Fähigkeit zur Aktivierung des vermeintlichen Rezeptors durch die Anhäufung der positiven Ladungen am N-Terminus des Peptids propagiert. Somit ist zu vermuten, dass eine Verstärkung der negativen Ladung die Wundheilungs-Eigenschaften verbessern sollte. Durch das Einbringen dieser Ladung in Form des sulfatierten Tyrosin 27 und einer damit verbundenen Steigerung des Wundheilungs-Effekts um bis zu 10 % lässt sich diese Hypothese bestätigen. Bei Betrachtung von Histatin1 in voller Länge wird deutlich, dass eine Sulfatierung der vier vorhandenen C-terminalen Tyrosine einem Großteil des Peptids eine negative Ladung verleiht (Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10 Oberflächenladung von Histatin1 bei Tyrosin-Sulfatierung**

Dargestellt sind die Oberflächenladungen von Histatin1 ohne und mit posttranslationaler Modifikation an Tyrosin 27, 30, 34 und 36. Während in **A** gegenüber dem positiv geladenen N-Terminus lediglich für Helix 3 eine negative Ladung zu erkennen ist, sorgen die sulfatierten Tyrosine in **B** dafür, dass der gesamte Bereich von Helix 2 und Helix 3 negativ geladen ist.

Dementsprechend sollte das vierfach sulfatierte Histatin1-Derivat gegenüber dem nicht-posttranslational modifizierten Peptid bei der Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors einen Vorteil besitzen. Entgegen der klassischen Funktion von Tyrosin-Sulfatierungen, durch die Erkennung der Sulfat-Gruppe eine Protein-Protein-Interaktion zu vermitteln, würde in diesem Fall lediglich eine Verstärkung der Ladungseigenschaften die Rezeptor-Affinität erhöhen. Im Vergleich mit Histatin3, für das zwar die Fähigkeit zur Wundheilung aber keine sulfatierten Derivate nachgewiesen werden konnten, ist dieses Modell also durchaus denkbar.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Sulfatierung von Tyrosinen ist eine weit verbreitete post-translationalen Modifikation, welche in den intrazellulären Transport sekretierter Peptide, in die Regulierung von extrazellulären Protein-Protein-Interaktionen, in die Regulierung verschiedenen Rezeptoren und in die Förderung proteolytischer Prozesse einiger Peptid-Hormone involviert ist. Innerhalb dieser Arbeit wurden mit dem N-Terminus des CCR5-Rezeptors und dem Speichel-Peptid Histatin1 zwei humane Vertreter Tyrosin-sulfatierter Peptide auf unterschiedliche Weise charakterisiert.

Als erstes sollten für eine Sequenz aus dem N-Terminus des CCR5-Rezeptors Binder mithilfe einer kombinatorischen Protein-Bibliothek identifiziert werden. Dazu wurde zunächst eine Bibliothek auf Basis der Phosphat-bindenden IRS1-PTB-Domäne entwickelt und das Ziel-Peptid CCR5<sup>12-18</sup> mittels Festphasen-Peptid-Synthese hergestellt. Für die Selektion bindender Mutanten wurde ein Ribosomen-Display etabliert. Die daraus hervorgehenden Mutanten wurden exprimiert und gereinigt sowie zur Bestimmung ihrer Bindungs-Affinität gegenüber der sulfatierten und der nicht-sulfatierten Variante des Ziel-Peptids in einem Fluoreszenz-Anisotropie-Assay untersucht. Dabei konnte eine Triple-Mutante der IRS1-PTB-Domäne identifiziert werden, welche zwischen dem Tyrosin-sulfatierten Peptid und der Kontrolle diskriminiert. Zudem zeigt ein mögliches Bindungs-Modell des sulfatierten CCR5<sup>12-18</sup> an die Mutante ein analoges Bindungsverhalten wie bei der gp120-Corezeptor-Bindung.

Als zweites sollte das im Gegensatz zu Histatin5 kaum untersuchte Histatin1 strukturell und funktionell charakterisiert werden. Dazu wurde dieses zunächst in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und die Expression in *E. coli* sowie die zugehörige Reinigung etabliert. Anschließend wurde die dreidimensionale Struktur des Peptids in hydrophiler Umgebung aufgelöst. Diese beinhaltet drei definierte Helices, welche zwei mögliche Grenz-Konformationen zueinander einnehmen. Außerdem wurden sowohl die antifungale Aktivität als auch die Wundheilungs-Eigenschaften von Histatin1 unter Beachtung der funktionellen Domänen untersucht. So kam ein N-terminales Fragment (Histatin1<sup>4-15</sup>) in einem Toxizitäts-Assay gegen *S. cerevisiae* zum Einsatz und zeigte volle antifungale Aktivität gegenüber Histatin1 in voller Länge. Des Weiteren wurde ein Wundheilungs-Assay laborintern etabliert, mit welchem ein C-terminales Fragment (Histatin1<sup>20-32</sup>) als sulfatierte und nicht-sulfatierte Variante verglichen werden konnte. Dabei wurde ein aktivierender Effekt des sulfatierten Histatin1<sup>20-32</sup> nachgewiesen, welcher jedoch vermutlich auf die eingebrachte negative Ladung in der C-terminalen Helix zurückzuführen ist. Bei Übertragung der jeweils minimal aktiven Fragmente auf die Struktur, entspricht der für die antifungale Aktivität verantwortliche Bereich dem Gelenk zwischen Helix 1 und 2 und das für die Wundheilung zuständige Fragment dem Gelenk zwischen Helix 2 und 3.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Walsh, C.T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G.J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2005**, *44*, 7342–7372.
2. Prabakaran, S.; Lippens, G.; Steen, H.; Gunawardena, J. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* **2012**, *4*, 565–583.
3. Huttner, W.B. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annual review of physiology* **1988**, *50*, 363–376.
4. Kanan, Y.; Siefert, J.C.; Kinter, M.; Al-Ubaidi, M.R. Complement factor H, vitronectin, and opticin are tyrosine-sulfated proteins of the retinal pigment epithelium. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105409.
5. Moore, K.L. The Biology and Enzymology of Protein Tyrosine O-Sulfation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24243–24246.
6. Bettelheim, F.R. Tyrosine O-sulfate in a peptide from fibrinogen. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 2838–2839.
7. Matsuzaki, Y.; Ogawa-Ohnishi, M.; Mori, A.; Matsubayashi, Y. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)* **2010**, *329*, 1065–1067.
8. Seibert, C.; Sakmar, T.P. Toward a framework for sulfoproteomics: Synthesis and characterization of sulfotyrosine-containing peptides. *Biopolymers* **2008**, *90*, 459–477.
9. Baeuerle, P.A.; Huttner, W.B. Tyrosine sulfation of yolk proteins 1, 2, and 3 in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of biological chemistry* **1985**, *260*, 6434–6439.
10. Yang, Y.-S.; Wang, C.-C.; Chen, B.-H.; Hou, Y.-H.; Hung, K.-S.; Mao, Y.-C. Tyrosine sulfation as a protein post-translational modification. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2015**, *20*, 2138–2164.
11. Venkatachalam, K.V. Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase: biochemistry, molecular biology and genetic deficiency. *IUBMB life* **2003**, *55*, 1–11.
12. Baeuerle, P.A.; Huttner, W.B. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *The Journal of cell biology* **1987**, *105*, 2655–2664.
13. Beisswanger, R.; Corbeil, D.; Vannier, C.; Thiele, C.; Dohrmann, U.; Kellner, R.; Ashman, K.; Niehrs, C.; Huttner, W.B. Existence of distinct tyrosylprotein sulfotransferase genes: Molecular characterization of tyrosylprotein sulfotransferase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 11134–11139.
14. Niehrs, C.; Huttner, W.B. Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase. *The EMBO journal* **1990**, *9*, 35–42.
15. Ouyang, Y.-b.; Lane, W.S.; Moore, K.L. Tyrosylprotein sulfotransferase: Purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 2896–2901.
16. Mishiro, E.; Sakakibara, Y.; Liu, M.-C.; Suiko, M. Differential Enzymatic Characteristics and Tissue-Specific Expression of Human TPST-1 and TPST-2. *J Biochem* **2006**, *140*, 731–737.
17. Teramoto, T.; Fujikawa, Y.; Kawaguchi, Y.; Kurogi, K.; Soejima, M.; Adachi, R.; Nakanishi, Y.; Mishiro-Sato, E.; Liu, M.-C.; Sakakibara, Y.; et al. Crystal structure of human tyrosylprotein sulfotransferase-2 reveals the mechanism of protein tyrosine sulfation reaction. *Nature communications* **2013**, *4*, 1572.
18. Rosenquist, G.L.; Nicholas, H.B., JR. Analysis of sequence requirements for protein tyrosine sulfation. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1993**, *2*, 215–222.
19. Hortin, G.; Folz, R.; Gordon, J.I.; Strauss, A.W. Characterization of sites of tyrosine sulfation in proteins and criteria for predicting their occurrence. *Biochemical and biophysical research communications* **1986**, *141*, 326–333.
20. Bundgaard, J.R.; Vuust, J.; Rehfeld, J.F. New consensus features for tyrosine O-sulfation determined by mutational analysis. *The Journal of biological chemistry* **1997**, *272*, 21700–21705.
21. Niehrs, C.; Kraft, M.; Lee, R.W.; Huttner, W.B. Analysis of the substrate specificity of tyrosylprotein sulfotransferase using synthetic peptides. *The Journal of biological chemistry* **1990**, *265*, 8525–8532.
22. Huang, S.-Y.; Shi, S.-P.; Qiu, J.-D.; Sun, X.-Y.; Suo, S.-B.; Liang, R.-P. PredSulSite: prediction of protein tyrosine sulfation sites with multiple features and analysis. *Analytical biochemistry* **2012**, *428*, 16–23.
23. Kehoe, J.W.; Bertozzi, C.R. Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chemistry & biology* **2000**, *7*, R57-61.
24. Hortin, G.L. Sulfation of a gamma-chain variant of human fibrinogen. *Biochemistry international* **1990**, *19*, 1355–1362.
25. Hortin, G.L. Sulfation of tyrosine residues in coagulation factor V. *Blood* **1990**, *76*, 946–952.
26. Higuchi, M.; Wong, C.; Kochhan, L.; Olek, K.; Aronis, S.; Kasper, C.K.; Kazazian, H.H.; Antonarakis, S.E. Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics* **1990**, *6*, 65–71.
27. Bond, M.; Jankowski, M.; Patel, H.; Karnik, S.; Strang, A.; Xu, B.; Rouse, J.; Koza, S.; Letwin, B.; Steckert, J.; et al. Biochemical characterization of recombinant factor IX. *Seminars in hematology* **1998**, *35*, 11–17.
28. Leyte, A.; van Schijndel, H.B.; Niehrs, C.; Huttner, W.B.; Verbeet, M.P.; Mertens, K.; van Mourik, J.A. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry* **1991**, *266*, 740–746.



57. Rizzuto, C.D.; Wyatt, R.; Hernández-Ramos, N.; Sun, Y.; Kwong, P.D.; Hendrickson, W.A.; Sodroski, J. A Conserved HIV gp120 Glycoprotein Structure Involved in Chemokine Receptor Binding. *Science* **1998**, *280*, 1949–1953.
58. Alkhatib, G.; Combadiere, C.; Broder, C.C.; Feng, Y.; Kennedy, P.E.; Murphy, P.M.; Berger, E.A. CC CKR5: A RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science* **1996**, *272*, 1955–1958.
59. Choe, H.; Farzan, M.; Sun, Y.; Sullivan, N.; Rollins, B.; Ponath, P.D.; Wu, L.; Mackay, C.R.; LaRosa, G.; Newman, W.; *et al.* The  $\beta$ -Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates. *Cell* **1996**, *85*, 1135–1148.
60. Deng, H.; Liu, R.; Ellmeier, W.; Choe, S.; Unutmaz, D.; Burkhart, M.; Di Marzio, P.; Marmon, S.; Sutton, R.E.; Hill, C.M.; *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **1996**, *381*, 661–666.
61. Dragic, T.; Litwin, V.; Allaway, G.P.; Martin, S.R.; Huang, Y.; Nagashima, K.A.; Cayanan, C.; Maddon, P.J.; Koup, R.A.; Moore, J.P.; *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **1996**, *381*, 667–673.
62. Feng, Y.; Broder, C.C.; Kennedy, P.E.; Berger, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)* **1996**, *272*, 872–877.
63. Clercq, E. de. The bicyclam AMD3100 story. *Nature reviews. Drug discovery* **2003**, *2*, 581–587.
64. Helseth, E.; Olshesky, U.; Furman, C.; Sodroski, J. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *Journal of virology* **1991**, *65*, 2119–2123.
65. Srinivas, S.K.; Srinivas, R.V.; Anantharamaiah, G.M.; Segrest, J.P.; Compans, R.W. Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* **1992**, *267*, 7121–7127.
66. Blanpain, C.; Doranz, B.J.; Vakili, J.; Rucker, J.; Govaerts, C.; Baik, S.S.; Lorthioir, O.; Migeotte, I.; Libert, F.; Baleux, F.; *et al.* Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 34719–34727.
67. Castellino, F.; Huang, A.Y.; Altan-Bonnet, G.; Stoll, S.; Scheinecker, C.; Germain, R.N. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **2006**, *440*, 890–895.
68. Rottman, J.B.; Ganley, K.P.; Williams, K.; Wu, L.; Mackay, C.R.; Ringler, D.J. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *The American journal of pathology* **1997**, *151*, 1341–1351.
69. Samson, M.; Labbe, O.; Mollereau, C.; Vassart, G.; Parmentier, M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3362–3367.
70. Dohlmann, H.G.; Caron, M.G.; DeBlasi, A.; Frielle, T.; Lefkowitz, R.J. Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2335–2342.
71. Fraser, C.M.; Chung, F.Z.; Wang, C.D.; Venter, J.C. Site-directed mutagenesis of human beta-adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 5478–5482.
72. Perlman, J.H.; Wang, W.; Nussenzweig, D.R.; Gershengorn, M.C. A disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the thyrotropin-releasing hormone receptor is critical for binding. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 24682–24685.
73. Savarese, T.M.; Wang, C.D.; Fraser, C.M. Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor. Role of conserved cysteines in receptor function. *The Journal of biological chemistry* **1992**, *267*, 11439–11448.
74. Blanpain, C.; Wittamer, V.; Vanderwinden, J.M.; Boom, A.; Renneboog, B.; Lee, B.; Le Poul, E.; El Asmar, L.; Govaerts, C.; Vassart, G.; *et al.* Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 23795–23804.
75. Kraft, K.; Olbrich, H.; Majoul, I.; Mack, M.; Proudfoot, A.; Oppermann, M. Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 34408–34418.
76. Percherancier, Y.; Planchenault, T.; Valenzuela-Fernandez, A.; Virelizier, J.L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Bachelier, F. Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 31936–31944.
77. Dragic, T.; Trkola, A.; Lin, S.W.; Nagashima, K.A.; Kajumo, F.; Zhao, L.; Olson, W.C.; Wu, L.; Mackay, C.R.; Allaway, G.P.; *et al.* Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of virology* **1998**, *72*, 279–285.
78. Rabut, G.E.; Konner, J.A.; Kajumo, F.; Moore, J.P.; Dragic, T. Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **1998**, *72*, 3464–3468.
79. Agrawal, L.; VanHorn-Ali, Z.; Berger, E.A.; Alkhatib, G. Specific inhibition of HIV-1 coreceptor activity by synthetic peptides corresponding to the predicted extracellular loops of CCR5. *Blood* **2004**, *103*, 1211–1217.
80. Yang, D.W.; Ohta, Y.; Yamaguchi, S.; Tsukada, Y.; Haraguchi, Y.; Hoshino, H.; Amagai, H.; Kobayashi, I. Sulfated colominic acid: an antiviral agent that inhibits the human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Antiviral research* **1996**, *31*, 95–104.
81. Roderiquez, G.; Oravec, T.; Yanagishita, M.; Bou-Habib, D.C.; Mostowski, H.; Norcross, M.A. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *Journal of virology* **1995**, *69*, 2233–2239.

82. Mondor, I.; Ugolini, S.; Sattentau, Q.J. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *Journal of virology* **1998**, *72*, 3623–3634.
83. Wu, L.; Gerard, N.P.; Wyatt, R.; Choe, H.; Parolin, C.; Ruffing, N.; Borsetti, A.; Cardoso, A.A.; Desjardin, E.; Newman, W.; *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **1996**, *384*, 179–183.
84. Trkola, A.; Dragic, T.; Arthos, J.; Binley, J.M.; Olson, W.C.; Allaway, G.P.; Cheng-Mayer, C.; Robinson, J.; Maddon, P.J.; Moore, J.P. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **1996**, *384*, 184–187.
85. Kwong, P.D.; Wyatt, R.; Robinson, J.; Sweet, R.W.; Sodroski, J.; Hendrickson, W.A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **1998**, *393*, 648–659.
86. Chen, B.; Vogan, E.M.; Gong, H.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C.; Harrison, S.C. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* **2005**, *433*, 834–841.
87. Seibert, C.; Cadene, M.; Sanfiz, A.; Chait, B.T.; Sakmar, T.P. Tyrosine sulfation of CCR5 N-terminal peptide by tyrosylprotein sulfotransferases 1 and 2 follows a discrete pattern and temporal sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 11031–11036.
88. Cormier, E.G.; Persuh, M.; Thompson, D.A.D.; Lin, S.W.; Sakmar, T.P.; Olson, W.C.; Dragic, T. Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 5762–5767.
89. Huang, C.-C.; Lam, S.N.; Acharya, P.; Tang, M.; Xiang, S.-H.; Hussan, S.S.-U.; Stanfield, R.L.; Robinson, J.; Sodroski, J.; Wilson, I.A.; *et al.* Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science (New York, N.Y.)* **2007**, *317*, 1930–1934.
90. Liu, R.; Paxton, W.A.; Choe, S.; Ceradini, D.; Martin, S.R.; Horuk, R.; MacDonald, M.E.; Stuhlmann, H.; Koup, R.A.; Landau, N.R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **1996**, *86*, 367–377.
91. Cormier, E.G.; Dragic, T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *Journal of virology* **2002**, *76*, 8953–8957.
92. Bar, S.; Alizon, M. Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *Journal of virology* **2004**, *78*, 811–820.
93. de Almeida, Patricia Del Vigna; Grégio, A.M.T.; Machado, M.A.N.; de Lima, Antonio Adilson Soares; Azevedo, L.R. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The journal of contemporary dental practice* **2008**, *9*, 72–80.
94. Lingström, P.; Moynihan, P. Nutrition, saliva, and oral health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **2003**, *19*, 567–569.
95. Leone, C.W.; Oppenheim, F.G. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *Journal of dental education* **2001**, *65*, 1054–1062.
96. Helmerhorst, E.J.; Van't Hof, W.; Breeuwer, P.; Veerman, E.C.; Abee, T.; Troxler, R.F.; Amerongen, A.V.; Oppenheim, F.G. Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 5643–5649.
97. Helmerhorst, E.J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 14637–14642.
98. Azen, E.A. Properties of salivary basic proteins showing polymorphism. *Biochemical genetics* **1973**, *9*, 69–86.
99. Sabatini, L.M.; Azen, E.A. Histatins, a family of salivary histidine-rich proteins, are encoded by at least two loci (HIS1 and HIS2). *Biochemical and biophysical research communications* **1989**, *160*, 495–502.
100. Oppenheim, F.G.; Xu, T.; McMillian, F.M.; Levitz, S.M.; Diamond, R.D.; Offner, G.D.; Troxler, R.F. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* **1988**, *263*, 7472–7477.
101. Oppenheim, F.G.; Yang, Y.C.; Diamond, R.D.; Hyslop, D.; Offner, G.D.; Troxler, R.F. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *The Journal of biological chemistry* **1986**, *261*, 1177–1182.
102. VanderSpek, J.C.; Offner, G.D.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. Molecular cloning of human submandibular histatins. *Archives of Oral Biology* **1990**, *35*, 137–143.
103. Troxler, R.F.; Offner, G.D.; Xu, T.; VanderSpek, J.C.; Oppenheim, F.G. Structural relationship between human salivary histatins. *Journal of dental research* **1990**, *69*, 2–6.
104. Santarpia, R.P.; Xu, L.; Lal, K.; Pollock, J.J. Salivary anti-candidal assays. *Oral microbiology and immunology* **1992**, *7*, 38–43.
105. Raj, P.A.; Marcus, E.; Sukumaran, D.K. Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biopolymers* **1998**, *45*, 51–67.
106. Brewer, D.; Lajoie, G. Structure-based design of potent histatin analogues. *Biochemistry* **2002**, *41*, 5526–5536.
107. Brewer, D.; Hunter, H.; Lajoie, G. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 247–256.
108. Melino, S.; Rufini, S.; Sette, M.; Morero, R.; Grottesi, A.; Paci, M.; Petruzzelli, R. Zn(2+) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry* **1999**, *38*, 9626–9633.



109. Melino, S.; Gallo, M.; Trotta, E.; Mondello, F.; Paci, M.; Petruzzelli, R. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. *Biochemistry* **2006**, *45*, 15373–15383.
110. Laussac, J.P.; Sarkar, B. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Biochemistry* **1984**, *23*, 2832–2838.
111. Harford, C.; Sarkar, B. Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties †. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 123–130.
112. Gusman, H.; Grogan, J.; Kagan, H.M.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. Salivary histatin 5 is a potent competitive inhibitor of the cysteine proteinase clostripain. *FEBS Letters* **2001**, *489*, 97–100.
113. Jensen, J.L.; Lamkin, M.S.; Oppenheim, F.G. Adsorption of Human Salivary Proteins to Hydroxyapatite: A Comparison Between Whole Saliva and Glandular Salivary Secretions. *Journal of dental research* **1992**, *71*, 1569–1576.
114. Hay, D.I. Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces. *Archives of Oral Biology* **1975**, *20*, 553–IN2.
115. Sugiyama, K. Anti-lipopolysaccharide activity of histatins, peptides from human saliva: Experientia. *Experientia* **1993**, *49*, 1095–1097.
116. Oren, Z.; Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **1998**, *47*, 451–463.
117. Gusman, H.; Travis, J.; Helmerhorst, E.J.; Potempa, J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infection and immunity* **2001**, *69*, 1402–1408.
118. Oudhoff, M.J.; Bolscher, Jan G M; Nazmi, K.; Kalay, H.; van 't Hof, Wim; Amerongen, Arie V Nieuw; Veerman, Enno C I. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2008**, *22*, 3805–3812.
119. Oudhoff, M.J.; Kroeze, K.L.; Nazmi, K.; van den Keijbus, Petra A M; van 't Hof, Wim; Fernandez-Borja, M.; Hordijk, P.L.; Gibbs, S.; Bolscher, Jan G M; Veerman, Enno C I. Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1,000-fold. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2009**, *23*, 3928–3935.
120. Blondelle, S.E.; Houghten, R.A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12688–12694.
121. Nishikata, M.; Kanehira, T.; Oh, H.; Tani, H.; Tazaki, M.; Kuboki, Y. Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Biochemical and biophysical research communications* **1991**, *174*, 625–630.
122. Matsuzaki, K.; Horikiri, C. Interactions of amyloid beta-peptide (1–40) with ganglioside-containing membranes. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4137–4142.
123. Bartie, K.L.; Devine, D.A.; Wilson, M.J.; Lewis, M.A.O. In vitro susceptibility of the *Streptococcus milleri* group to antimicrobial peptides. *International endodontic journal* **2008**, *41*, 586–592.
124. MacKay, B.J.; Denepitiya, L.; Iacono, V.J.; Krost, S.B.; Pollock, J.J. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* **1984**, *44*, 695–701.
125. Shimotoyodome, A.; Kobayashi, H.; Tokimitsu, I.; Matsukubo, T.; Takaesu, Y. Statherin and histatin 1 reduce parotid saliva-promoted *Streptococcus mutans* strain MT8148 adhesion to hydroxyapatite surfaces. *Caries research* **2006**, *40*, 403–411.
126. Imamura, Y.; Fujigaki, Y.; Oomori, Y.; Ouryouji, K.; Yanagisawa, S.; Miyazawa, H.; Wang, P.-L. Transcriptional regulation of the salivary histatin gene: finding of a strong positive regulatory element and its binding protein. *Journal of biochemistry* **2009**, *145*, 279–288.
127. Khan, S.A.; Fidel, P.L.; Thunayyan, A.A.; Varlotta, S.; Meiller, T.F.; Jabra-Rizk, M.A. Impaired Histatin-5 Levels and Salivary Antimicrobial Activity against *C. albicans* in HIV Infected Individuals. *Journal of AIDS & clinical research* **2013**, *4*.
128. Lin, A.L.; Shi, Q.; Johnson, D.A.; Patterson, T.F.; Rinaldi, M.G.; Yeh, C.-K. Further Characterization of Human Salivary Anticandidal Activities in a Human Immunodeficiency Virus-Positive Cohort by Use of Microassays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1999**, *6*, 851–855.
129. Vukosavljevic, D.; Custodio, W.; Del Bel Cury, A A; Siqueira, W.L. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization. *Yeast (Chichester, England)* **2012**, *29*, 459–466.
130. Tsai, H.; Bobek, L.A. Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* **1998**, *9*, 480–497.
131. Rayhan, R.; Xu, L.; Santarpia, R.P.; Tylenda, C.A.; Pollock, J.J. Antifungal activities of salivary histidine-rich polypeptides against *Candida albicans* and other oral yeast isolates. *Oral microbiology and immunology* **1992**, *7*, 51–52.
132. Driscoll J; Zuo Y; Xu T; Troxler RF; Oppenheim GF. Investigation of the anti-candidal mechanism of histatins. *Journal of dental research* **1996**, *1996*, 358.
133. Pollock, J.J.; Denepitiya, L.; MacKay, B.J.; Iacono, V.J. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Infection and immunity* **1984**, *44*, 702–707.
134. Raj, P.A.; Edgerton, M.; Levine, M.J. Salivary histatin 5: dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. *The Journal of biological chemistry* **1990**, *265*, 3898–3905.
135. Xu, L.; Lal, K.; Santarpia, R.P.; Pollock, J.J. Salivary proteolysis of histidine-rich polypeptides and the antifungal activity of peptide degradation products. *Archives of Oral Biology* **1993**, *38*, 277–283.

136. Xu, T.; Levitz, S.M.; Diamond, R.D.; Oppenheim, F.G. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infection and immunity* **1991**, *59*, 2549–2554.
137. Xu, T.; Oppenheim, F.G. Salivary antimicrobials: where are we? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, 117–131.
138. Melino, S.; Santone, C.; Di Nardo, P.; Sarkar, B. Histatins: salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications. *The FEBS journal* **2014**, *281*, 657–672.
139. Edgerton, M.; Koshlukova, S.E.; Lo, T.E.; Chrzan, B.G.; Straubinger, R.M.; Raj, P.A. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 20438–20447.
140. Baev, D.; Li, X.; Edgerton, M. Genetically engineered human salivary histatin genes are functional in *Candida albicans*: development of a new system for studying histatin candidacidal activity. *Microbiology (Reading, England)* **2001**, *147*, 3323–3334.
141. Xu, Y.; Ambudkar, I.; Yamagishi, H.; Swaim, W.; Walsh, T.J.; O'Connell, B.C. Histatin 3-mediated killing of *Candida albicans*: effect of extracellular salt concentration on binding and internalization. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1999**, *43*, 2256–2262.
142. Sun, J.N.; Li, W.; Jang, W.S.; Nayyar, N.; Sutton, M.D.; Edgerton, M. Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. *Molecular microbiology* **2008**, *70*, 1246–1260.
143. López-Ribot, J.L.; Allouash, H.M.; Masten, B.J.; Chaffin, W.L. Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infection and immunity* **1996**, *64*, 3333–3340.
144. Becker, J.; Walter, W.; Yan, W.; Craig, E.A. Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Molecular and cellular biology* **1996**, *16*, 4378–4386.
145. Murakami, H.; Pain, D.; Blobel, G. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *The Journal of cell biology* **1988**, *107*, 2051–2057.
146. Li, X.S.; Sun, J.N.; Okamoto-Shibayama, K.; Edgerton, M. *Candida albicans* cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281*, 22453–22463.
147. Koshlukova, S.E.; Araujo, M.W.; Baev, D.; Edgerton, M. Released ATP is an extracellular cytotoxic mediator in salivary histatin 5-induced killing of *Candida albicans*. *Infection and immunity* **2000**, *68*, 6848–6856.
148. Koshlukova, S.E.; Lloyd, T.L.; Araujo, M.W.; Edgerton, M. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 18872–18879.
149. Ruissen, A.L.; Groenink, J.; Helmerhorst, E.J.; Walgreen-Weterings, E.; Van't Hof, W.; Veerman, E.C.; Nieuw Amerongen, A.V. Effects of histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. *Biochemical Journal* **2001**, *356*, 361–368.
150. Isola, R.; Isola, M.; Conti, G.; Lantini, M.S.; Riva, A. Histatin-induced alterations in *Candida albicans*: a microscopic and submicroscopic comparison. *Microscopy research and technique* **2007**, *70*, 607–616.
151. Baev, D.; Rivetta, A.; Vylkova, S.; Sun, J.N.; Zeng, G.-F.; Slayman, C.L.; Edgerton, M. The TRK1 Potassium Transporter Is the Critical Effector for Killing of *Candida albicans* by the Cationic Protein, Histatin 5. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 55060–55072.
152. Baev, D.; Li, X.S.; Dong, J.; Keng, P.; Edgerton, M. Human Salivary Histatin 5 Causes Disordered Volume Regulation and Cell Cycle Arrest in *Candida albicans*. *Infection and immunity* **2002**, *70*, 4777–4784.
153. Lamkin, M.S.; Oppenheim, F.G. Structural features of salivary function. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* **1993**, *4*, 251–259.
154. Helmerhorst, E.J.; Van't Hof, W.; Veerman, E.C.; Simoons-Smit, I.; Nieuw Amerongen, A.V. Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *The Biochemical journal* **1997**, *326* (Pt 1), 39–45.
155. Oppenheim, F.G.; Helmerhorst, E.J.; Lendenmann, U.; Offner, G.D.; Zaragoza, O. Anti-Candidal Activity of Genetically Engineered Histatin Variants with Multiple Functional Domains. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51479.
156. Rothstein, D.M.; Spacciapoli, P.; Tran, L.T.; Xu, T.; Roberts, F.D.; Dalla Serra, M.; Buxton, D.K.; Oppenheim, F.G.; Friden, P. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2001**, *45*, 1367–1373.
157. Paquette, D.W.; Waters, G.S.; Stefanidou, V.L.; Lawrence, H.P.; Friden, P.M.; O'Connor, S.M.; Sperati, J.D.; Oppenheim, F.G.; Hutchens, L.H.; Williams, R.C. Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical salivary histatins. *Journal of clinical periodontology* **1997**, *24*, 216–222.
158. Mickels, N.; McManus, C.; Massaro, J.; Friden, P.; Braman, V.; D'Agostino, R.; Oppenheim, F.; Warbington, M.; Dibart, S.; van Dyke, T. Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* **2001**, *28*, 404–410.
159. Engeland, C.G.; Bosch, J.A.; Cacioppo, J.T.; Marucha, P.T. Mucosal wound healing: the roles of age and sex. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* **2006**, *141*, 1193–7; discussion 1198.
160. Kiecolt-Glaser, J.K.; Marucha, P.T.; Malarkey, W.B.; Mercado, A.M.; Glaser, R. Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet (London, England)* **1995**, *346*, 1194–1196.
161. Barrandon, Y.; Green, H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The roles of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor. *Cell* **1987**, *50*, 1131–1137.
162. Jagla, W.; Wiede, A.; Hinz, M.; Dietzmann, K.; Gulicher, D.; Gerlach, K.L.; Hoffmann, W. Secretion of TFF-peptides by human salivary glands. *Cell and tissue research* **1999**, *298*, 161–166.
163. van Setten, G.B. Basic fibroblast growth factor in human saliva: detection and physiological implications. *The Laryngoscope* **1995**, *105*, 610–612.
164. Thesleff, I.; Viinikka, L.; Saxen, L.; Lehtonen, E.; Perheentupa, J. The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. *Life sciences* **1988**, *43*, 13–18.
165. Nam, J.-W.; Chung, J.-W.; Kho, H.-S.; Chung, S.-C.; Kim, Y.-K. Nerve growth factor concentration in human saliva. *Oral diseases* **2007**, *13*, 187–192.

166. Murphy, R.A.; Watson, A.Y.; Metz, J.; Forssmann, W.G. The mouse submandibular gland: an exocrine organ for growth factors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **1980**, *28*, 890–902.
167. Brand, H.S.; Ligtenberg, A.J.; Veerman, E.C. Saliva and Wound Healing. In *Saliva: Secretion and Functions*; Ligtenberg, A., Veerman, E., Eds.; S. KARGER AG: Basel, 2014, pp. 52–60.
168. Sun, X.; Salih, E.; Oppenheim, F.G.; Helmerhorst, E.J. Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2009**, *23*, 2691–2701.
169. Helmerhorst, E.J.; Oppenheim, F.G. Saliva: a dynamic proteome. *Journal of dental research* **2007**, *86*, 680–693.
170. Driscoll, J.; Zuo, Y.; Xu, T.; Choi, J.R.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. Functional comparison of native and recombinant human salivary histatin 1. *Journal of dental research* **1995**, *74*, 1837–1844.
171. Cabras, T.; Fanali, C.; Monteiro, J.A.; Amado, F.; Inzitari, R.; Desiderio, C.; Scarano, E.; Giardina, B.; Castagnola, M.; Messina, I. Tyrosine polysulfation of human salivary histatin 1. A post-translational modification specific of the submandibular gland. *Journal of proteome research* **2007**, *6*, 2472–2480.
172. Johnsson, M.; Richardson, C.F.; Bergey, E.J.; Levine, M.J.; Nancollas, G.H. The effects of human salivary cystatins and statherin on hydroxyapatite crystallization. *Archives of Oral Biology* **1991**, *36*, 631–636.
173. Moreno, E.C.; Kresak, M.; Hay, D.I. Adsorption of two human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy- and fluorapatites. *Archives of Oral Biology* **1978**, *23*, 525–533.
174. Schlesinger, D.H.; Buku, A.; Wyssbrod, H.R.; Hay, D.I. Chemical synthesis of phosphoserine-phosphoserine, a partial analogue of human salivary statherin, a protein inhibitor of calcium phosphate precipitation in human saliva. *International journal of peptide and protein research* **1987**, *30*, 257–262.
175. Siqueira, W.L.; Margolis, H.C.; Helmerhorst, E.J.; Mendes, F.M.; Oppenheim, F.G. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *Journal of dental research* **2010**, *89*, 626–630.
176. Vitorino, R.; Calheiros-Lobo, M.J.; Duarte, J.A.; Domingues, P.M.; Amado, F.M.L. Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. *Journal of separation science* **2008**, *31*, 523–537.
177. Yin, A.; Margolis, H.C.; Grogan, J.; Yao, Y.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins. *Archives of Oral Biology* **2003**, *48*, 361–368.
178. Gusman, H.; Lendenmann, U.; Grogan, J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. Is salivary histatin 5 a metalloprotein? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2001**, *1545*, 86–95.
179. Grogan, J.; McKnight, C.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. *FEBS Letters* **2001**, *491*, 76–80.
180. Dean, M.; Carrington, M.; Winkler, C.; Huttley, G.A.; Smith, M.W.; Allikmets, R.; Goedert, J.J.; Buchbinder, S.P.; Vittinghoff, E.; Gomperts, E.; *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science (New York, N.Y.)* **1996**, *273*, 1856–1862.
181. Samson, M.; Libert, F.; Doranz, B.J.; Rucker, J.; Liesnard, C.; Farber, C.M.; Saragosti, S.; Lapoumeroulie, C.; Cogniaux, J.; Forceille, C.; *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **1996**, *382*, 722–725.
182. Dragic, T.; Trkola, A.; Thompson, D.A.; Cormier, E.G.; Kajumo, F.A.; Maxwell, E.; Lin, S.W.; Ying, W.; Smith, S.O.; Sakmar, T.P.; *et al.* A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 5639–5644.
183. Maeda, K.; Das, D.; Yin, P.D.; Tsuchiya, K.; Ogata-Aoki, H.; Nakata, H.; Norman, R.B.; Hackney, L.A.; Takaoka, Y.; Mitsuya, H. Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *Journal of molecular biology* **2008**, *381*, 956–974.
184. Maeda, K.; Das, D.; Ogata-Aoki, H.; Nakata, H.; Miyakawa, T.; Tojo, Y.; Norman, R.; Takaoka, Y.; Ding, J.; Arnold, G.F.; *et al.* Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281*, 12688–12698.
185. Atkinson, J.C.; Yeh, C.-K.; Oppenheim, F.G.; Bermudez, D.; Baum, B.J.; Fox, P.C. Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **1990**, *3*, 41–48.
186. Cannon, R.D.; Holmes, A.R.; Mason, A.B.; Monk, B.C. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? *Journal of dental research* **1995**, *74*, 1152–1161.
187. White, T.C.; Marr, K.A.; Bowden, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews* **1998**, *11*, 382–402.
188. Vranken, W.F.; Boucher, W.; Stevens, T.J.; Fogh, R.H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E.L.; Markley, J.L.; Ionides, J.; Laue, E.D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* **2005**, *59*, 687–696.
189. Güntert, P. *Cyana*, 2002.
190. GraphPad Software SDCU. *GraphPad Prism*, 2009.
191. Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R.D.; Bairoch, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research* **2003**, *31*, 3784–3788.
192. Schrödinger, L.L. *The PyMOL Molecular Graphics System*, 2010.
193. Schagger, H.; Jagow, G. von. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **1987**, *166*, 368–379.

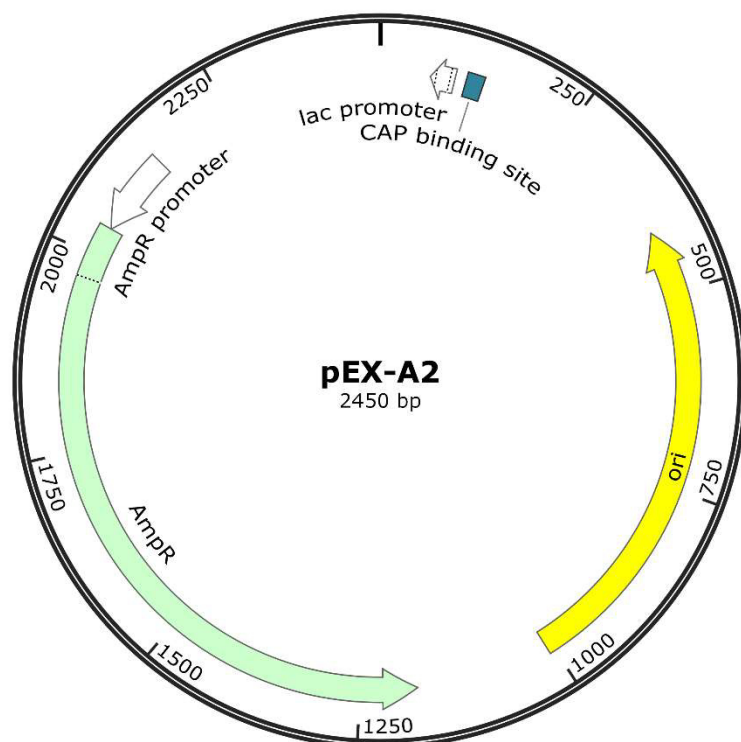
194. Amstutz, P.; Forrer, P.; Zahnd, C.; Pluckthun, A. In vitro display technologies: novel developments and applications. *Current opinion in biotechnology* **2001**, *12*, 400–405.
195. Aue, W.P. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229.
196. Půček, L.; Sklenář, V. A simple approach to elimination of phase gradients in NMR spectra obtained with selective excitation sequences for water suppression. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1990**, *86*, 376–383.
197. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenář, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **1992**, *2*, 661–665.
198. Cavanagh, J.; Rance, M. Sensitivity improvement in isotropic mixing (TOCSY) experiments. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1990**, *88*, 72–85.
199. Jeener, J.; Meier, B.H.; Bachmann, P.; Ernst, R.R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.
200. Schanda, P.; Brutscher, B. Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 8014–8015.
201. Cavanagh, J. *Protein NMR spectroscopy: Principles and practice*, 2nd ed; Academic Press: Amsterdam, Boston, 2007.
202. Wüthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids*; Wiley: New York, 1986.
203. Pace, C.N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1995**, *4*, 2411–2423.
204. Merrifield, R.B. Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Advances in enzymology and related areas of molecular biology: Vol. 32*; Nord, F.F., Ed.; Interscience: New York, Chichester, 1969; Volume 32, pp. 221–296.
205. Gustafson, T.A.; He, W.; Craparo, A.; Schaub, C.D.; O'Neill, T.J. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Molecular and cellular biology* **1995**, *15*, 2500–2508.
206. O'Neill, T.J.; Craparo, A.; Gustafson, T.A. Characterization of an interaction between insulin receptor substrate 1 and the insulin receptor by using the two-hybrid system. *Molecular and cellular biology* **1994**, *14*, 6433–6442.
207. White, M.F.; Livingston, J.N.; Backer, J.M.; Lauris, V.; Dull, T.J.; Ullrich, A.; Kahn, C.R. Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* **1988**, *54*, 641–649.
208. Wolf, G.; Trub, T.; Ottinger, E.; Groninga, L.; Lynch, A.; White, M.F.; Miyazaki, M.; Lee, J.; Shoelson, S.E. PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 27407–27410.
209. Zhou, M.-M.; Huang, B.; Olejniczak, E.T.; Meadows, R.P.; Shuker, S.B.; Miyazaki, M.; Trub, T.; Shoelson, S.E.; Feisk, S.W. *IRS-1 PTB domain complexed with IL-4 receptor phosphopeptide, NMR, minimized average structure*, 1997.
210. Schaffitzel, C.; Hanes, J.; Jermutus, L.; Pluckthun, A. Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. *Journal of immunological methods* **1999**, *231*, 119–135.
211. Makeyev, E.V.; Kolb, V.A.; Spirin, A.S. Enzymatic activity of the ribosome-bound nascent polypeptide. *FEBS Letters* **1996**, *378*, 166–170.
212. Chou, P.Y.; Fasman, G.D. Conformational parameters for amino acids in helical,  $\beta$ -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* **1974**, *13*, 211–222.
213. Chou, P.Y.; Fasman, G.D. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **1974**, *13*, 222–245.
214. Combet, C.; Blanchet, C.; Geourjon, C.; Deléage, G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in biochemical sciences* **2000**, *25*, 147–150.
215. Wüthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids*; Wiley: New York, 1986.
216. Anteunis, Marc J. O.; Borremans, Frans A. M.; Stewart, J.M.; London, R.E. 360-MHz hydrogen-1 NMR conformational analysis of Gly-Pro-X peptides (X = Ala, Cha, Phe). *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2187–2191.
217. Kern, D.; Kern, G.; Scherer, G.; Fischer, G.; Drakenberg, T. Kinetic Analysis of Cyclophilin-Catalyzed Prolyl Cis/Trans Isomerization by Dynamic NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13594–13602.
218. Rossi, P.; Swapna, G V T; Huang, Y.J.; Aramini, J.M.; Anklin, C.; Conover, K.; Hamilton, K.; Xiao, R.; Acton, T.B.; Ertekin, A.; *et al.* A microscale protein NMR sample screening pipeline. *Journal of biomolecular NMR* **2010**, *46*, 11–22.
219. Damberg, P.; Jarvet, J.; Allard, P.; Mets, Ü.; Rigler, R.; Gräslund, A. <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H NMR Relaxation and Fluorescence Anisotropy Decay Study of Tyrosine Dynamics in Motilin. *Biophysical Journal* **2002**, *83*, 2812–2825.
220. Edgerton, M.; Koshlukova, S.E. Salivary Histatin 5 and its Similarities to the Other Antimicrobial Proteins in Human Saliva. *Advances in Dental Research* **2000**, *14*, 16–21.
221. Poveda, E.; Soriano, V. Optimizing management of treatment-naïve and treatment-experienced HIV+ patients: the role of maraviroc. *HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)* **2010**, *2*, 51–58.
222. McGaughey, G.B.  $\pi$ -Stacking Interactions. ALIVE AND WELL IN PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 15458–15463.
223. Veldkamp, C.T.; Ziarek, J.J.; Peterson, F.C.; Chen, Y.; Volkman, B.F. Targeting SDF-1/CXCL12 with a ligand that prevents activation of CXCR4 through structure-based drug design. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 7242–7243.
224. Patel, S.; Mathonet, P.; Jaulent, A.M.; Ullman, C.G. Selection of a high-affinity WW domain against the extracellular region of VEGF receptor isoform-2 from a combinatorial library using CIS display. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **2013**, *26*, 307–315.
225. Staub, O.; Rotin, D. WW domains. *Structure (London, England : 1993)* **1996**, *4*, 495–499.

226. Socolich, M.; Lockless, S.W.; Russ, W.P.; Lee, H.; Gardner, K.H.; Ranganathan, R. Evolutionary information for specifying a protein fold. *Nature* **2005**, *437*, 512–518.
227. Russ, W.P.; Lowery, D.M.; Mishra, P.; Yaffe, M.B.; Ranganathan, R. Natural-like function in artificial WW domains. *Nature* **2005**, *437*, 579–583.
228. Jager, M.; Zhang, Y.; Bieschke, J.; Nguyen, H.; Dendle, M.; Bowman, M.E.; Noel, J.P.; Gruebele, M.; Kelly, J.W. Structure-function-folding relationship in a WW domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 10648–10653.
229. Jäger, M.; Nguyen, H.; Dendle, M.; Gruebele, M.; Kelly, J.W. Influence of hPin1 WW N-terminal domain boundaries on function, protein stability, and folding. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2007**, *16*, 1495–1501.
230. Palacios, R.; Schimke, R.T. Identification and isolation of ovalbumin-synthesizing polysomes. 3. Precipitation of ovalbumin polysomes from a heterologous cell-free protein-synthesizing system. *The Journal of biological chemistry* **1973**, *248*, 1424–1430.
231. Hanes, J.; Pluckthun, A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 4937–4942.
232. Mattheakis, L.C.; Bhatt, R.R.; Dower, W.J. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 9022–9026.
233. Gersuk, G.M.; Corey, M.J.; Corey, E.; Stray, J.E.; Kawasaki, G.H.; Vessella, R.L. High-affinity peptide ligands to prostate-specific antigen identified by polysome selection. *Biochemical and biophysical research communications* **1997**, *232*, 578–582.
234. Odegrip, R.; Coomber, D.; Eldridge, B.; Hederer, R.; Kuhlman, P.A.; Ullman, C.; FitzGerald, K.; McGregor, D. CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 2806–2810.
235. Masai, H.; Kaziro, Y.; Arai, K. Definition of oriR, the minimum DNA segment essential for initiation of R1 plasmid replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1983**, *80*, 6814–6818.
236. Nikolett, S.; Bird, P.; Praszkie, J.; Pittard, J. Analysis of the incompatibility determinants of I-complex plasmids. *Journal of bacteriology* **1988**, *170*, 1311–1318.
237. Praszkie, J.; Pittard, A.J. Role of CIS in replication of an IncB plasmid. *Journal of bacteriology* **1999**, *181*, 2765–2772.
238. Praszkie, J.; Murthy, S.; Pittard, A.J. Effect of CIS on activity in trans of the replication initiator protein of an IncB plasmid. *Journal of bacteriology* **2000**, *182*, 3972–3980.
239. Situ, H. Role of  $\alpha$ -helical conformation of histatin-5 in candidacidal activity examined by proline variants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2000**, *1475*, 377–382.
240. Ramalingam, K.; Gururaja, T.L.; Ramasubbu, N.; Levine, M.J. Stabilization of helix by side-chain interactions in histatin-derived peptides: role in candidacidal activity. *Biochemical and biophysical research communications* **1996**, *225*, 47–53.
241. Wishart, D.S.; Bigam, C.G.; Holm, A.; Hodges, R.S.; Sykes, B.D. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J Biomol NMR* **1995**, *5*, 67–81.
242. Wishart, D.S.; Sykes, B.D.; Richards, F.M. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647–1651.
243. Den Hertog, A.L.; Wong Fong Sang, Harro W.; Kraayenhof, R.; Bolscher, J.G.M.; Van't Hof, W.; Veerman, E.C.I.; Nieuw Amerongen, A.V. Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. *The Biochemical journal* **2004**, *379*, 665–672.
244. Joyce, J.G.; Cook, J.C.; Przysiecki, C.T.; Lehman, E.D. Chromatographic separation of low-molecular-mass recombinant proteins and peptides on Superdex 30 prep grade. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications* **1994**, *662*, 325–334.
245. Torchia, D.A.; Lyster, J.R. Molecular mobility of polypeptides containing proline as determined by <sup>13</sup>C magnetic resonance. *Biopolymers* **1974**, *13*, 97–114.
246. Grathwohl, C.; Wüthrich, K. The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers* **1976**, *15*, 2025–2041.
247. Brandts, J.F.; Halvorson, H.R.; Brennan, M. Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953–4963.
248. Grathwohl, C.; Wüthrich, K. Nmr studies of the rates of proline-cis-trans isomerization in oligopeptides. *Biopolymers* **1981**, *20*, 2623–2633.
249. Helmerhorst, E.J.; Reijnders, I.M.; Van't Hof, W.; Simoons-Smit, I.; Veerman, E.C.; Amerongen, A.V. Amphotericin B- and fluconazole-resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1999**, *43*, 702–704.
250. Raj, P.A.; Soni, S.D.; Levine, M.J. Membrane-induced helical conformation of an active candidacidal fragment of salivary histatins. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269*, 9610–9619.
251. Monigatti, F.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Jung, E. The Sulfinator: Predicting tyrosine sulfation sites in protein sequences. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 769–770.

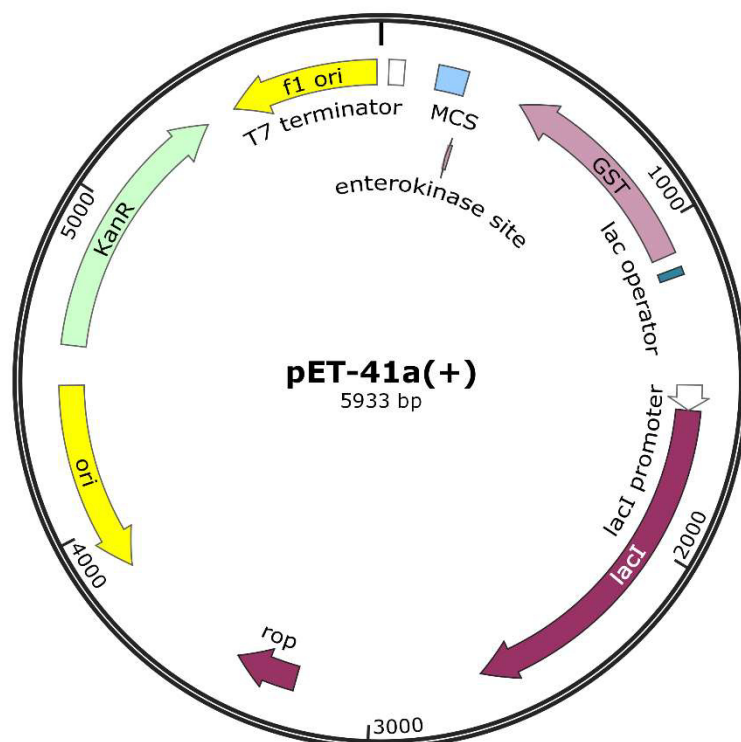
## ANHANG

## A Vektoren

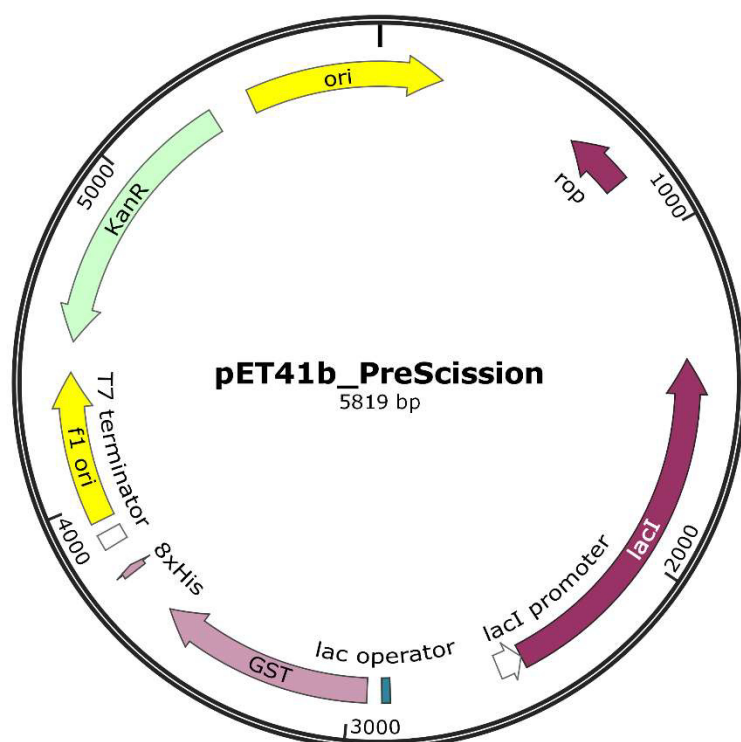
## pEX-A2



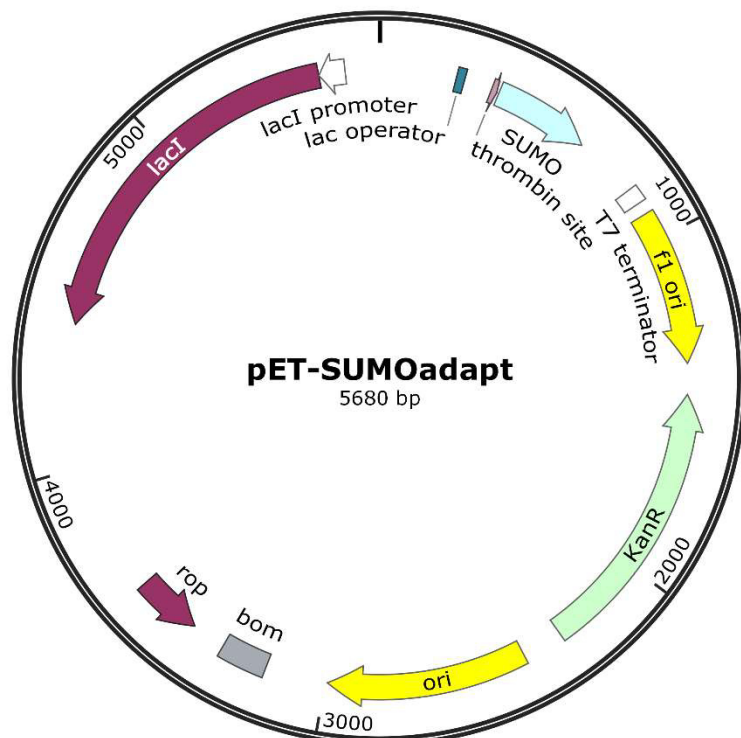
## pET41a(+)



pET41\_PreScission

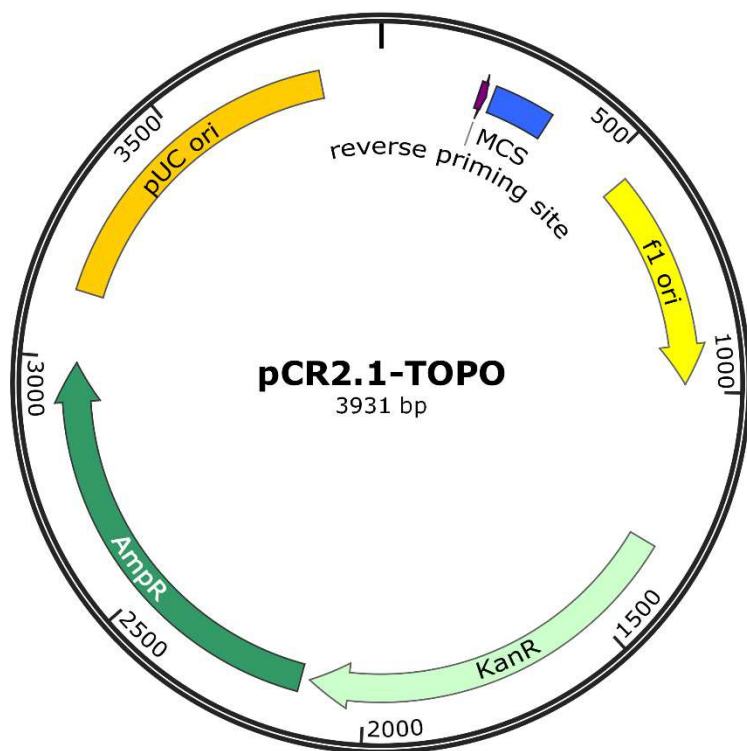


pET-SUMOadapt

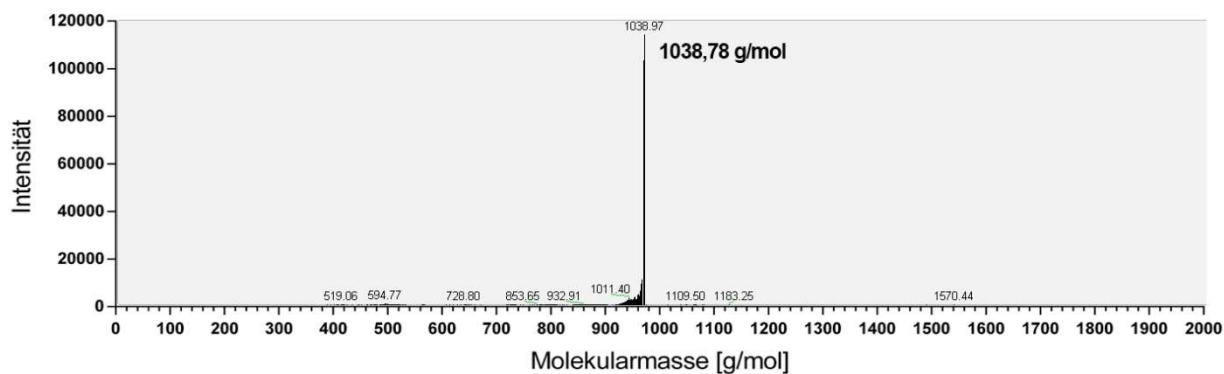




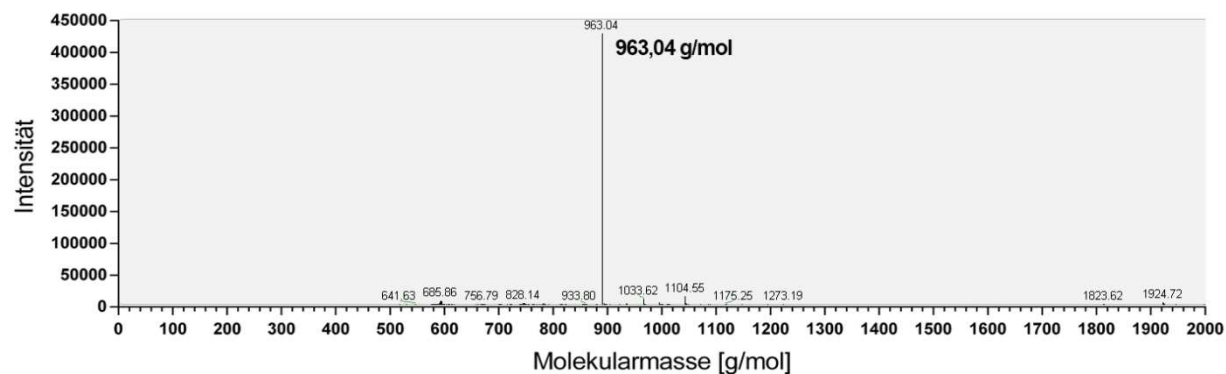
## pCR2.1-TOPO



## B LC-MS-Spektren

LC-MS-Spektrum von MANT-IN<sub>S</sub>YTTSA-OH

## LC-MS-Spektrum von MANT-INYYTSA-OH





## C NMR-Daten

### Assignment

	N	H <sub>N</sub>	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	H $\delta$	H $\epsilon$
Asp1	-	-	-	-	-	-	-
Ser2	-	-	-	-	-	-	-
His3	120,855	8,561	4,627	3,152/3,241		7,175	8,301
Glu4	121,509	5,367	4,217	1,932/1,999	2,234		
Lys5	122,720	8,381	4,238	1,709/1,767	1,350/1,411	1,643	2,969
Arg6	121,559	8,277	4,235	1,659	1,484	3,066/3,067	7,269
His7	120,677	8,124	4,770	3,061/3,153		7,090	8,203
His8	120,170	8,418	4,600	3,026/3,106		7,050	8,141
Gly9	110,292	8,608	3,881				
Tyr10	120,414	8,125	4,507	2,958		7,046	6,765
Arg11	123,335	8,245	4,213	1,632/1,726	1,465	3,080	7,198
Arg12	121,899	8,259	4,186	1,697	1,538	3,109	7,269
Lys13	122,246	8,335	4,109	1,621/1,622	1,214/1,300	1,580	2,905/2,907
Phe14	120,990	8,247	4,517	2,993	H $\eta$ =7,139	7,119	7,250
His15	120,455	8,351	4,541	3,018/3,121		7,055	8,131
Glu16	121,614	8,351	4,197	2,215	1,975/2,215		
Lys17	121,942	8,411	4,191	1,642/1,671	1,306	1,604	2,926
His18	122,298	8,149	7,786	3,031/3,110		7,047	8,152
His19	120,020	80441	4,628	3,035/3,131		7,065	8,118
Ser20	117,045	8,503	4,407	3,794/3,823			
His21	120,872	8,610	4,633	3,107/3,201		7,116	8,248
Arg22	122,502	8,265	4,176	1,652/1,722	1,496	3,080	7,246
Glu23	121,194	8,413	4,160	1,816/2,042	2,143		
Phe24	120,633	8,054	-	2,802/3,016	H $\eta$ =7,174	7,177	7,263
Pro25			4,294	1,597/2,037	1,793/1,841	3,429/3,629	
Phe26	119,562	7,970	4,540	2,945	H $\eta$ =7,119	7,092	7,247
Tyr27	121,847	8,030	4,502	2,830/3,000		7,021	6,756
Gly28	109,325	7,593	3,708/3,793				
Asp29	120,223	8,090	4,575	2,492/2,601			
Tyr30	120,742	8,186	4,451	2,875/3,027		7,001	6,744
Gly31	109,762	8,309	3,842/3,938				
Ser32	115,302	8,136	4,368	3,811/3,848			
Asn33	119,875	8,386	4,639	2,631/2,707	N $\delta$ 2=112,645	H $\delta$ 2a=6,827	H $\delta$ 2b=7,497
Tyr34	120,127	7,966	4,433	2,829/2,876		6,938	6,712
Leu35	122,713	7,815	4,166	1,329/1,332	1,249	0,709/0,776	
Tyr36	119,147	7,770	4,554	2,799/3,081		7,030	6,746
Asp37	121,339	8,230	4,651	2,561/2,697			
Asn38	121,794	7,890	4,443	2,635/2,711	N $\delta$ 2=112,582	H $\delta$ 2a=6,760	H $\delta$ 2b=7,446

## NOE-Restraints

37 ASP HB2	38 ASN H	4.56	#peak	2 #SUP	1.00	#QF	0.81
37 ASP H	37 ASP HB2	3.55	#peak	15 #SUP	0.95	#QF	0.95
37 ASP H	37 ASP HB3	3.55	#peak	16 #SUP	0.85	#QF	0.85
29 ASP H	29 ASP HB2	3.57	#peak	18 #SUP	0.96	#QF	0.96
29 ASP H	29 ASP HB3	3.57	#peak	19 #SUP	0.91	#QF	0.91
35 LEU H	35 LEU HG	3.19	#peak	21 #SUP	0.91	#QF	0.91
35 LEU H	35 LEU QD1	4.43	#peak	22 #SUP	1.00		
35 LEU H	35 LEU QD2	4.43	#peak	23 #SUP	0.99	#QF	0.99
4 GLU H	4 GLU HB2	3.82	#peak	38 #SUP	0.91	#QF	0.85
4 GLU HB2	5 LYS H	4.41	#peak	38 #SUP	0.91	#QF	0.85
23 GLU H	23 GLU HG2	5.28	#peak	46 #SUP	1.00	#QF	0.97
23 GLU H	23 GLU HG3	5.28	#peak	46 #SUP	1.00	#QF	0.97
36 TYR H	36 TYR HB3	3.77	#peak	66 #SUP	0.99	#QF	0.99
36 TYR H	36 TYR HB2	3.05	#peak	67 #SUP	0.91	#QF	0.91
36 TYR H	36 TYR QD	3.56	#peak	68 #SUP	1.00		
34 TYR H	34 TYR HB2	3.54	#peak	71 #SUP	0.91	#QF	0.91
34 TYR H	34 TYR HB3	3.54	#peak	72 #SUP	0.98	#QF	0.98
34 TYR H	34 TYR QD	3.59	#peak	73 #SUP	0.98	#QF	0.98
30 TYR H	30 TYR HB2	3.99	#peak	76 #SUP	0.98	#QF	0.27
30 TYR H	30 TYR HB3	3.99	#peak	77 #SUP	0.92	#QF	0.92
30 TYR H	30 TYR QD	4.33	#peak	78 #SUP	1.00		
10 TYR H	10 TYR HB2	3.59	#peak	83 #SUP	0.78	#QF	0.50
10 TYR H	10 TYR HB3	3.59	#peak	83 #SUP	0.78	#QF	0.50
27 TYR H	27 TYR HB3	3.93	#peak	87 #SUP	0.88	#QF	0.24
27 TYR H	27 TYR QD	4.28	#peak	88 #SUP	1.00		
14 PHE H	14 PHE QD	4.91	#peak	95 #SUP	1.00	#QF	0.58
27 TYR HA	28 GLY H	3.55	#peak	105 #SUP	1.00		
27 TYR HB2	28 GLY H	4.25	#peak	107 #SUP	0.93	#QF	0.93
27 TYR HB3	28 GLY H	4.25	#peak	109 #SUP	0.96	#QF	0.96
26 PHE H	26 PHE HB2	3.71	#peak	155 #SUP	0.84	#QF	0.64
26 PHE H	26 PHE HB3	3.71	#peak	155 #SUP	0.84	#QF	0.64
11 ARG HE	14 PHE QD	4.65	#peak	158 #SUP	0.44	#QF	0.44
10 TYR QE	11 ARG HD2	5.50	#peak	196 #SUP	1.00	#QF	0.44
10 TYR QE	11 ARG HD3	5.50	#peak	196 #SUP	1.00	#QF	0.44
36 TYR HA	36 TYR QD	3.09	#peak	198 #SUP	0.87	#QF	0.87
34 TYR HA	34 TYR QD	3.79	#peak	222 #SUP	1.00		
30 TYR HA	30 TYR QE	4.91	#peak	223 #SUP	0.34	#QF	0.34
30 TYR HA	30 TYR QD	3.02	#peak	225 #SUP	0.84	#QF	0.84
38 ASN HA	38 ASN HD21	4.14	#peak	226 #SUP	0.75	#QF	0.75
10 TYR HA	10 TYR QE	5.39	#peak	232 #SUP	0.96	#QF	0.80
27 TYR HA	27 TYR QE	5.50	#peak	232 #SUP	0.96	#QF	0.80
10 TYR HA	10 TYR QD	3.38	#peak	235 #SUP	0.84	#QF	0.66
27 TYR HA	27 TYR QD	3.59	#peak	235 #SUP	0.84	#QF	0.66
26 PHE H	26 PHE QD	4.18	#peak	244 #SUP	0.96	#QF	0.96
26 PHE HA	26 PHE QD	4.00	#peak	245 #SUP	0.79	#QF	0.26
14 PHE HA	14 PHE QE	4.83	#peak	253 #SUP	0.79	#QF	0.45
26 PHE HA	26 PHE QE	5.26	#peak	253 #SUP	0.79	#QF	0.45
38 ASN H	38 ASN HD21	5.50	#peak	278 #SUP	0.99	#QF	0.99
33 ASN HA	33 ASN HD22	5.39	#peak	284 #SUP	0.95	#QF	0.95
33 ASN HA	33 ASN HD21	5.39	#peak	285 #SUP	0.82	#QF	0.82
35 LEU HA	35 LEU HG	3.74	#peak	291 #SUP	1.00		
3 HIS HA	3 HIS HD2	4.26	#peak	308 #SUP	0.92	#QF	0.92
27 TYR H	27 TYR HB2	3.93	#peak	310 #SUP	0.41	#QF	0.41
24 PHE H	24 PHE QD	4.08	#peak	312 #SUP	0.98	#QF	0.98
13 LYS H	13 LYS HG3	4.38	#peak	347 #SUP	0.99	#QF	0.99
13 LYS H	13 LYS HG2	4.38	#peak	348 #SUP	0.99	#QF	0.99
13 LYS H	13 LYS HB3	3.09	#peak	349 #SUP	0.83	#QF	0.83
17 LYS H	17 LYS HG2	5.42	#peak	365 #SUP	1.00		
17 LYS H	17 LYS HG3	5.42	#peak	365 #SUP	1.00		
5 LYS H	5 LYS HG3	4.81	#peak	367 #SUP	1.00		
5 LYS H	5 LYS HB2	4.05	#peak	368 #SUP	0.87	#QF	0.87
5 LYS H	5 LYS HG2	4.81	#peak	374 #SUP	0.99	#QF	0.99
5 LYS H	5 LYS HB3	4.05	#peak	387 #SUP	1.00		
5 LYS HB3	5 LYS HE2	5.50	#peak	389 #SUP	0.93	#QF	0.81
5 LYS HB3	5 LYS HE3	5.50	#peak	389 #SUP	0.93	#QF	0.81

5	LYS	HB2	5	LYS	HE2	5.50	#peak	390	#SUP	0.96	#QF	0.80
5	LYS	HB2	5	LYS	HE3	5.50	#peak	390	#SUP	0.96	#QF	0.80
17	LYS	H	17	LYS	HA	2.88	#peak	392	#SUP	0.97	#QF	0.97
17	LYS	H	17	LYS	HE2	5.50	#peak	393	#SUP	0.72	#QF	0.37
17	LYS	H	17	LYS	HE3	5.50	#peak	393	#SUP	0.72	#QF	0.37
17	LYS	H	17	LYS	HB2	3.68	#peak	400	#SUP	0.74	#QF	0.35
17	LYS	H	17	LYS	HB3	3.68	#peak	400	#SUP	0.74	#QF	0.35
13	LYS	H	13	LYS	HE2	5.50	#peak	411	#SUP	0.84	#QF	0.36
13	LYS	H	13	LYS	HE3	5.50	#peak	411	#SUP	0.84	#QF	0.36
13	LYS	H	13	LYS	HD2	5.50	#peak	419	#SUP	1.00		
13	LYS	H	13	LYS	HD3	5.50	#peak	419	#SUP	1.00		
14	PHE	HB2	15	HIS	H	5.19	#peak	426	#SUP	0.55	#QF	0.33
6	ARG	H	6	ARG	HD2	5.50	#peak	452	#SUP	0.99	#QF	0.64
6	ARG	H	6	ARG	HD3	5.50	#peak	452	#SUP	0.99	#QF	0.64
6	ARG	H	6	ARG	HG3	4.69	#peak	455	#SUP	0.91	#QF	0.83
22	ARG	HB3	22	ARG	HE	5.07	#peak	470	#SUP	0.88	#QF	0.88
11	ARG	H	11	ARG	HB3	4.09	#peak	488	#SUP	0.98	#QF	0.87
11	ARG	H	11	ARG	HB2	3.35	#peak	489	#SUP	0.73	#QF	0.64
6	ARG	H	6	ARG	HG2	4.69	#peak	490	#SUP	0.44	#QF	0.24
11	ARG	HB3	11	ARG	HE	4.91	#peak	492	#SUP	0.76	#QF	0.76
11	ARG	HB2	11	ARG	HE	5.50	#peak	494	#SUP	0.99	#QF	0.99
10	TYR	H	10	TYR	QD	4.75	#peak	510	#SUP	1.00	#QF	0.89
36	TYR	HB3	38	ASN	H	5.29	#peak	514	#SUP	0.80	#QF	0.80
37	ASP	HB3	38	ASN	H	4.56	#peak	515	#SUP	0.91	#QF	0.91
36	TYR	HB2	37	ASP	H	3.83	#peak	518	#SUP	0.96	#QF	0.96
35	LEU	HB2	36	TYR	H	4.96	#peak	520	#SUP	1.00	#QF	0.97
35	LEU	HB3	36	TYR	H	4.96	#peak	520	#SUP	1.00	#QF	0.97
35	LEU	HG	36	TYR	H	3.59	#peak	521	#SUP	0.94	#QF	0.94
35	LEU	QD1	36	TYR	H	4.59	#peak	522	#SUP	0.97	#QF	0.97
35	LEU	QD2	36	TYR	H	4.59	#peak	523	#SUP	1.00		
33	ASN	HA	35	LEU	H	4.99	#peak	525	#SUP	0.56	#QF	0.56
34	TYR	HB3	35	LEU	H	4.33	#peak	526	#SUP	0.96	#QF	0.96
34	TYR	HB2	35	LEU	H	4.33	#peak	527	#SUP	0.97	#QF	0.97
32	SER	HB2	34	TYR	H	5.50	#peak	529	#SUP	0.86	#QF	0.74
32	SER	HB3	34	TYR	H	5.50	#peak	530	#SUP	0.87	#QF	0.87
33	ASN	HB3	34	TYR	H	4.28	#peak	531	#SUP	0.95	#QF	0.95
33	ASN	HB2	34	TYR	H	4.28	#peak	532	#SUP	0.97	#QF	0.97
32	SER	HB2	33	ASN	H	4.82	#peak	534	#SUP	1.00	#QF	0.23
32	SER	HB3	33	ASN	H	4.82	#peak	535	#SUP	0.98	#QF	0.98
30	TYR	HB2	31	GLY	H	4.36	#peak	538	#SUP	0.97	#QF	0.97
30	TYR	HB3	31	GLY	H	4.36	#peak	540	#SUP	1.00		
29	ASP	HB2	30	TYR	H	4.17	#peak	546	#SUP	0.93	#QF	0.93
29	ASP	HB3	30	TYR	H	4.17	#peak	547	#SUP	0.96	#QF	0.96
28	GLY	HA3	29	ASP	H	3.48	#peak	548	#SUP	0.97	#QF	0.97
28	GLY	HA2	29	ASP	H	3.48	#peak	549	#SUP	0.99	#QF	0.99
6	ARG	HG2	7	HIS	H	5.50	#peak	554	#SUP	0.86	#QF	0.71
6	ARG	HG3	7	HIS	H	5.50	#peak	554	#SUP	0.86	#QF	0.71
4	GLU	HB3	5	LYS	H	4.41	#peak	561	#SUP	0.47	#QF	0.47
24	PHE	H	25	PRO	HD3	5.34	#peak	563	#SUP	1.00		
24	PHE	H	25	PRO	HD2	5.34	#peak	564	#SUP	0.98	#QF	0.98
32	SER	HB2	34	TYR	QD	4.98	#peak	585	#SUP	0.88	#QF	0.88
34	TYR	QD	35	LEU	HA	4.44	#peak	587	#SUP	0.91	#QF	0.91
34	TYR	QE	35	LEU	HA	4.90	#peak	588	#SUP	0.90	#QF	0.90
33	ASN	HA	34	TYR	QD	4.59	#peak	589	#SUP	0.85	#QF	0.85
36	TYR	HA	36	TYR	QE	4.66	#peak	590	#SUP	0.41	#QF	0.41
34	TYR	QD	35	LEU	HG	4.20	#peak	592	#SUP	0.80	#QF	0.80
13	LYS	HG3	14	PHE	H	4.55	#peak	593	#SUP	0.96	#QF	0.96
13	LYS	HG2	14	PHE	H	4.55	#peak	595	#SUP	0.89	#QF	0.89
25	PRO	HB3	26	PHE	H	3.95	#peak	596	#SUP	0.87	#QF	0.87
25	PRO	HA	26	PHE	H	2.86	#peak	597	#SUP	0.87	#QF	0.87
25	PRO	HD3	26	PHE	H	5.50	#peak	598	#SUP	0.98	#QF	0.98
25	PRO	HD2	26	PHE	H	5.50	#peak	599	#SUP	0.89	#QF	0.89
25	PRO	HB2	26	PHE	H	3.95	#peak	601	#SUP	1.00		
21	HIS	HA	21	HIS	HD2	3.98	#peak	605	#SUP	0.86	#QF	0.86
19	HIS	HA	19	HIS	HD2	3.37	#peak	611	#SUP	0.55	#QF	0.55
17	LYS	HB2	18	HIS	H	5.48	#peak	615	#SUP	0.95	#QF	0.37
18	HIS	HA	18	HIS	HD2	4.66	#peak	623	#SUP	0.96	#QF	0.29

8	HIS	HA	8	HIS	HD2	5.34	#peak	632	#SUP	0.86	#QF	0.79
3	HIS	HB3	4	GLU	H	4.78	#peak	636	#SUP	0.99	#QF	0.99
36	TYR	HB3	37	ASP	H	3.45	#peak	647	#SUP	0.93	#QF	0.93
26	PHE	HB2	27	TYR	H	4.51	#peak	649	#SUP	0.85	#QF	0.55
26	PHE	HB3	27	TYR	H	4.51	#peak	649	#SUP	0.85	#QF	0.55
3	HIS	HB2	4	GLU	H	4.78	#peak	656	#SUP	0.99	#QF	0.99
4	GLU	H	4	GLU	HB3	3.82	#peak	665	#SUP	0.85	#QF	0.34
7	HIS	HE1	16	GLU	HG2	5.50	#peak	668	#SUP	0.53	#QF	0.53
7	HIS	HE1	16	GLU	HG3	5.50	#peak	669	#SUP	0.85	#QF	0.85
14	PHE	H	14	PHE	HB2	3.06	#peak	671	#SUP	0.60	#QF	0.60
14	PHE	HA	14	PHE	QD	3.18	#peak	672	#SUP	0.78	#QF	0.78
12	ARG	H	12	ARG	HG2	5.34	#peak	682	#SUP	1.00	#QF	0.95
12	ARG	H	12	ARG	HG3	5.34	#peak	682	#SUP	1.00	#QF	0.95
12	ARG	HB2	12	ARG	HE	5.50	#peak	685	#SUP	1.00		
12	ARG	HB3	12	ARG	HE	5.50	#peak	685	#SUP	1.00		
17	LYS	HB3	18	HIS	H	5.48	#peak	693	#SUP	0.99	#QF	0.59
35	LEU	HB2	36	TYR	QD	5.50	#peak	696	#SUP	0.98	#QF	0.93
35	LEU	HB3	36	TYR	QD	5.50	#peak	696	#SUP	0.98	#QF	0.93
35	LEU	HG	36	TYR	QD	4.39	#peak	701	#SUP	0.97	#QF	0.97
10	TYR	QD	11	ARG	HB2	3.61	#peak	722	#SUP	0.56	#QF	0.56
22	ARG	HB2	22	ARG	HE	5.07	#peak	723	#SUP	0.78	#QF	0.28
11	ARG	HB2	14	PHE	QD	5.15	#peak	724	#SUP	1.00		
13	LYS	HB2	14	PHE	QD	5.50	#peak	724	#SUP	1.00		
10	TYR	QD	13	LYS	HD2	5.50	#peak	727	#SUP	0.70	#QF	0.41
10	TYR	QD	13	LYS	HD3	5.50	#peak	727	#SUP	0.70	#QF	0.41
10	TYR	QD	11	ARG	HG2	5.50	#peak	729	#SUP	0.78	#QF	0.55
10	TYR	QD	11	ARG	HG3	5.50	#peak	729	#SUP	0.78	#QF	0.55
11	ARG	HB3	14	PHE	QD	5.25	#peak	735	#SUP	0.77	#QF	0.77
10	TYR	QE	11	ARG	HB3	5.50	#peak	739	#SUP	1.00		
10	TYR	QE	11	ARG	HB2	4.05	#peak	740	#SUP	0.91	#QF	0.91
34	TYR	QE	35	LEU	HG	5.48	#peak	744	#SUP	0.97	#QF	0.42
35	LEU	HG	36	TYR	QE	5.50	#peak	744	#SUP	0.97	#QF	0.42
24	PHE	QD	25	PRO	HD3	4.48	#peak	745	#SUP	0.93	#QF	0.93
24	PHE	QD	25	PRO	HD2	4.48	#peak	746	#SUP	0.95	#QF	0.95
11	ARG	HA	11	ARG	HE	4.49	#peak	753	#SUP	0.43	#QF	0.43
11	ARG	HA	14	PHE	QD	4.01	#peak	754	#SUP	0.62	#QF	0.62
10	TYR	QD	11	ARG	HA	3.62	#peak	755	#SUP	0.62	#QF	0.62
11	ARG	HA	14	PHE	QE	4.24	#peak	756	#SUP	0.51	#QF	0.51
10	TYR	QE	11	ARG	HA	4.37	#peak	757	#SUP	0.41	#QF	0.41
30	TYR	QD	31	GLY	HA2	5.09	#peak	761	#SUP	0.96	#QF	0.96
30	TYR	QD	31	GLY	HA3	5.09	#peak	766	#SUP	0.94	#QF	0.94
27	TYR	QD	28	GLY	HA3	5.16	#peak	768	#SUP	0.91	#QF	0.91
32	SER	HB3	34	TYR	QD	4.98	#peak	770	#SUP	0.68	#QF	0.68
27	TYR	QD	28	GLY	HA2	5.16	#peak	774	#SUP	0.92	#QF	0.92
37	ASP	HA	38	ASN	HD21	4.47	#peak	777	#SUP	0.44	#QF	0.44
28	GLY	H	29	ASP	H	4.08	#peak	802	#SUP	0.97	#QF	0.97
27	TYR	H	28	GLY	H	3.97	#peak	803	#SUP	0.97	#QF	0.97
36	TYR	H	37	ASP	H	3.69	#peak	804	#SUP	0.94	#QF	0.94
23	GLU	H	24	PHE	H	3.90	#peak	805	#SUP	0.90	#QF	0.90
33	ASN	H	34	TYR	H	4.28	#peak	806	#SUP	0.95	#QF	0.95
37	ASP	H	38	ASN	H	4.04	#peak	807	#SUP	0.92	#QF	0.92
10	TYR	QD	11	ARG	H	4.11	#peak	816	#SUP	0.65	#QF	0.45
34	TYR	QD	35	LEU	H	4.34	#peak	817	#SUP	0.97	#QF	0.97
34	TYR	QD	35	LEU	QD1	5.40	#peak	821	#SUP	0.95	#QF	0.95
34	TYR	QD	35	LEU	QD2	5.40	#peak	823	#SUP	1.00		
35	LEU	QD1	36	TYR	QD	5.00	#peak	827	#SUP	0.95	#QF	0.95
35	LEU	QD2	36	TYR	QD	5.00	#peak	828	#SUP	0.97	#QF	0.97
3	HIS	QB	3	HIS	HD2	3.49	#peak	142				
3	HIS	QB	4	GLU	H	4.19	#peak	636				
4	GLU	QB	5	LYS	H	3.74	#peak	561				
5	LYS	H	5	LYS	QB	3.28	#peak	368				
5	LYS	H	5	LYS	QG	4.10	#peak	374				
5	LYS	QB	5	LYS	QE	4.10	#peak	390				
6	ARG	H	6	ARG	QB	3.10	#peak	453				
6	ARG	H	6	ARG	QG	3.90	#peak	490				
6	ARG	HA	6	ARG	QG	3.58	#peak	379				
6	ARG	QB	6	ARG	HE	5.15	#peak	723				

6 ARG QB	7 HIS H	4.23	#peak	615
7 HIS QB	7 HIS HD2	3.31	#peak	146
7 HIS HE1	16 GLU QG	4.82	#peak	668
10 TYR H	10 TYR QB	3.14	#peak	83
10 TYR QD	13 LYS QG	5.34	#peak	698
10 TYR QE	11 ARG QD	4.72	#peak	196
11 ARG QG	14 PHE HB2	3.39	#peak	442
11 ARG QG	14 PHE QD	4.49	#peak	732
11 ARG QG	14 PHE QE	5.34	#peak	734
11 ARG QD	14 PHE QD	3.97	#peak	146
12 ARG H	12 ARG QB	3.45	#peak	681
12 ARG H	12 ARG QG	4.54	#peak	682
12 ARG QB	12 ARG QD	3.26	#peak	483
12 ARG HE	16 GLU QB	4.56	#peak	704
12 ARG HE	16 GLU QG	4.62	#peak	712
13 LYS H	13 LYS QG	3.74	#peak	347
13 LYS H	13 LYS QD	4.73	#peak	419
13 LYS QG	14 PHE H	3.90	#peak	593
13 LYS QG	14 PHE QD	4.66	#peak	697
13 LYS QG	14 PHE QE	4.73	#peak	695
13 LYS QD	14 PHE QD	5.34	#peak	726
15 HIS H	15 HIS QB	3.61	#peak	99
15 HIS QB	16 GLU H	3.91	#peak	100
16 GLU H	16 GLU QB	3.56	#peak	660
16 GLU H	16 GLU QG	3.27	#peak	657
16 GLU HA	16 GLU QG	3.48	#peak	658
16 GLU QB	17 LYS H	4.40	#peak	562
16 GLU QG	17 LYS H	4.36	#peak	648
17 LYS H	17 LYS QB	3.04	#peak	400
17 LYS H	17 LYS QG	4.65	#peak	365
17 LYS H	17 LYS QD	4.09	#peak	403
17 LYS QD	18 HIS H	5.33	#peak	692
18 HIS H	18 HIS QB	3.47	#peak	76
21 HIS QB	21 HIS HD2	3.44	#peak	144
21 HIS QB	22 ARG H	4.40	#peak	467
22 ARG H	22 ARG QB	3.41	#peak	453
23 GLU H	23 GLU QB	3.38	#peak	45
23 GLU H	23 GLU QG	4.54	#peak	46
23 GLU QB	24 PHE H	3.83	#peak	650
23 GLU QB	24 PHE QD	5.34	#peak	706
24 PHE H	24 PHE QB	3.15	#peak	189
24 PHE H	25 PRO QD	4.48	#peak	564
24 PHE QB	25 PRO QD	4.31	#peak	799
24 PHE QD	25 PRO QB	5.19	#peak	708
24 PHE QD	25 PRO QG	4.30	#peak	714
24 PHE QD	25 PRO QD	3.70	#peak	745
25 PRO QB	26 PHE QD	5.34	#peak	726
25 PRO QB	27 TYR H	4.67	#peak	866
25 PRO QG	26 PHE H	4.59	#peak	600
26 PHE H	26 PHE QB	3.10	#peak	155
26 PHE QB	27 TYR H	3.90	#peak	649
27 TYR H	27 TYR QB	3.19	#peak	310
27 TYR QB	28 GLY H	3.68	#peak	107
27 TYR QD	28 GLY QA	4.37	#peak	768
27 TYR QE	28 GLY QA	4.91	#peak	776
29 ASP H	29 ASP QB	3.07	#peak	19
29 ASP QB	30 TYR H	3.63	#peak	547
29 ASP QB	30 TYR HA	4.12	#peak	793
29 ASP QB	31 GLY H	5.12	#peak	543
30 TYR H	30 TYR QB	3.14	#peak	77
30 TYR HA	31 GLY QA	4.89	#peak	845
30 TYR QB	31 GLY H	3.74	#peak	538
30 TYR QD	31 GLY QA	4.31	#peak	761
32 SER H	32 SER QB	3.29	#peak	64
32 SER QB	34 TYR H	4.74	#peak	530
32 SER QB	34 TYR QE	4.59	#peak	771
33 ASN H	33 ASN QB	3.66	#peak	11

33	ASN	HA	33	ASN	QD2	4.59	#peak	284
33	ASN	QB	33	ASN	QD2	3.03	#peak	5
34	TYR	H	34	TYR	QB	2.95	#peak	71
34	TYR	QB	35	LEU	H	3.67	#peak	527
34	TYR	QD	35	LEU	QQD	4.72	#peak	821
34	TYR	QE	35	LEU	QB	4.75	#peak	742
34	TYR	QE	35	LEU	QQD	4.49	#peak	822
35	LEU	H	35	LEU	QB	3.18	#peak	27
35	LEU	H	35	LEU	QQD	3.88	#peak	23
35	LEU	HA	35	LEU	QQD	3.74	#peak	293
35	LEU	QB	36	TYR	H	4.24	#peak	520
35	LEU	QB	36	TYR	QD	4.65	#peak	696
35	LEU	QB	36	TYR	QE	5.34	#peak	743
35	LEU	QQD	36	TYR	H	3.97	#peak	523
35	LEU	QQD	36	TYR	QE	4.03	#peak	824
37	ASP	H	37	ASP	QB	2.99	#peak	16
37	ASP	QB	38	ASN	HD21	5.29	#peak	279
38	ASN	H	38	ASN	QB	3.49	#peak	3

## Struktur-Statistik

str	target	upper limits			van der Waals			torsion angles		
	function	#	rms	max	#	sum	max	#	rms	max
1	2.69E-02	0	0.0035	0.08	0	0.3	0.07	0	0.0328	0.20
2	2.84E-02	0	0.0003	0.01	0	0.4	0.08	0	0.0369	0.22
3	2.94E-02	0	0.0009	0.01	0	0.5	0.08	0	0.1012	0.73
4	3.12E-02	0	0.0021	0.05	0	0.4	0.08	0	0.0553	0.22
5	3.54E-02	0	0.0010	0.01	0	0.6	0.07	0	0.0530	0.23
6	4.80E-02	0	0.0036	0.07	0	0.7	0.08	0	0.0893	0.40
7	5.72E-02	2	0.0073	0.12	0	0.4	0.07	0	0.0382	0.19
8	6.81E-02	0	0.0038	0.09	0	0.5	0.13	0	0.0325	0.20
9	8.32E-02	1	0.0059	0.10	0	0.5	0.10	0	0.0382	0.19
10	8.56E-02	0	0.0019	0.04	0	0.7	0.12	0	0.2525	1.08
Ave	4.94E-02	0	0.0030	0.06	0	0.5	0.09	0	0.0730	0.37
	2.18E-02	1	0.0021	0.04	0	0.1	0.02	0	0.0640	0.29
Min	2.69E-02	0	0.0003	0.01	0	0.3	0.07	0	0.0325	0.19
Max	8.56E-02	2	0.0073	0.12	0	0.7	0.13	0	0.2525	1.08
Cut				0.10			0.20			5.00

Constraints violated in 3 or more structures:

	#	mean	max.	1	5	10
0 violated distance constraints.						
0 violated van der Waals constraints.						
0 violated angle constraints.						

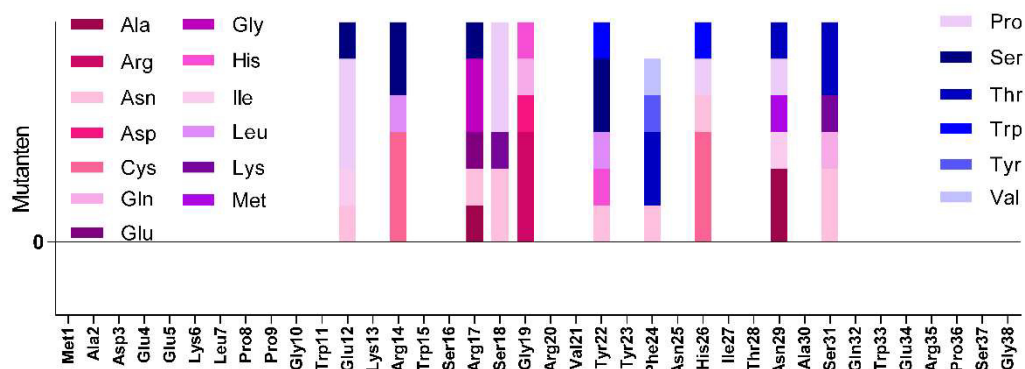
RMSDs for residues 1..38:

Average backbone RMSD to mean : 4.06 0.78 A (2.74..5.53 A; 10 structures)  
Average heavy atom RMSD to mean : 5.35 0.54 A (4.29..6.26 A; 10 structures)

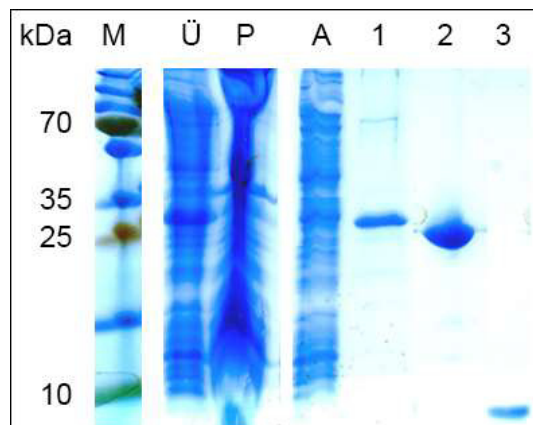
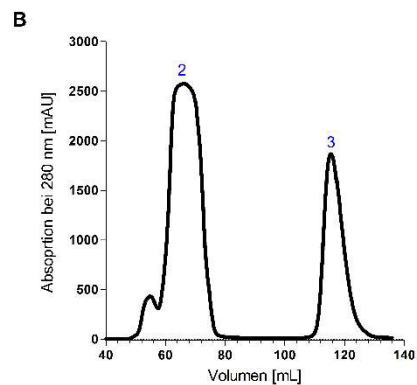
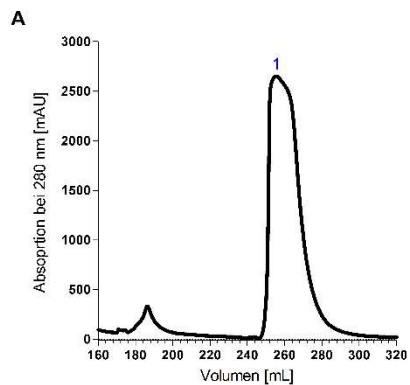
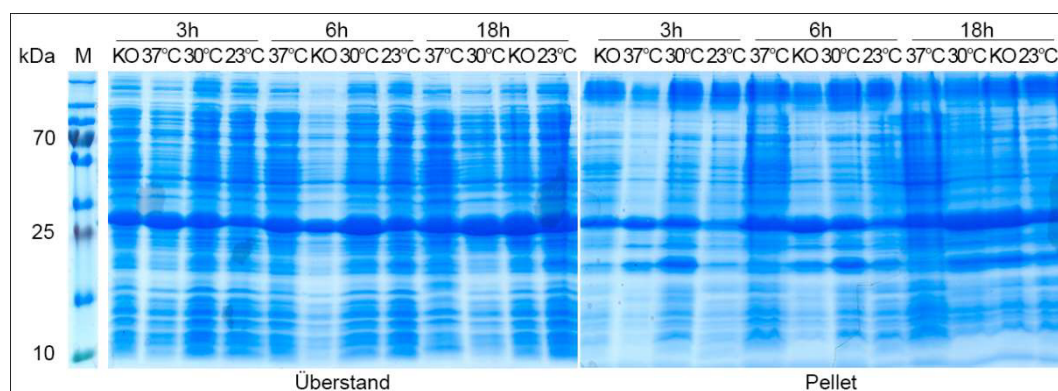
## D Vorversuche

### Diversität der WW-Domäne-Bibliothek

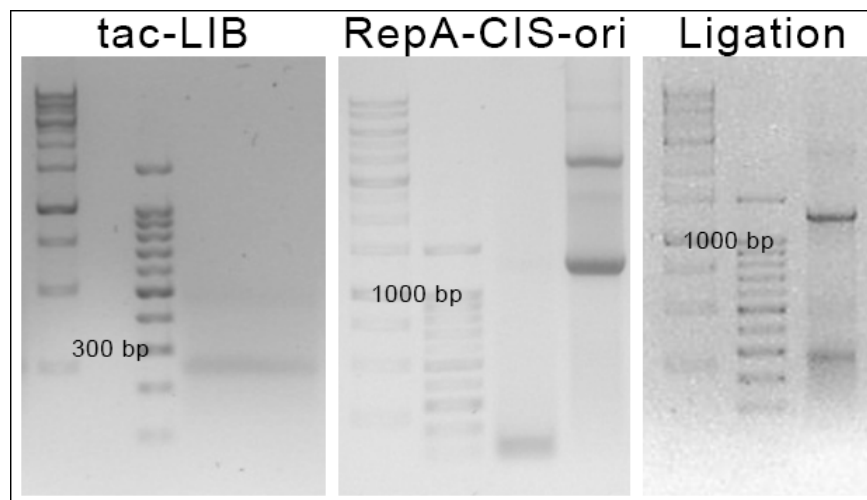
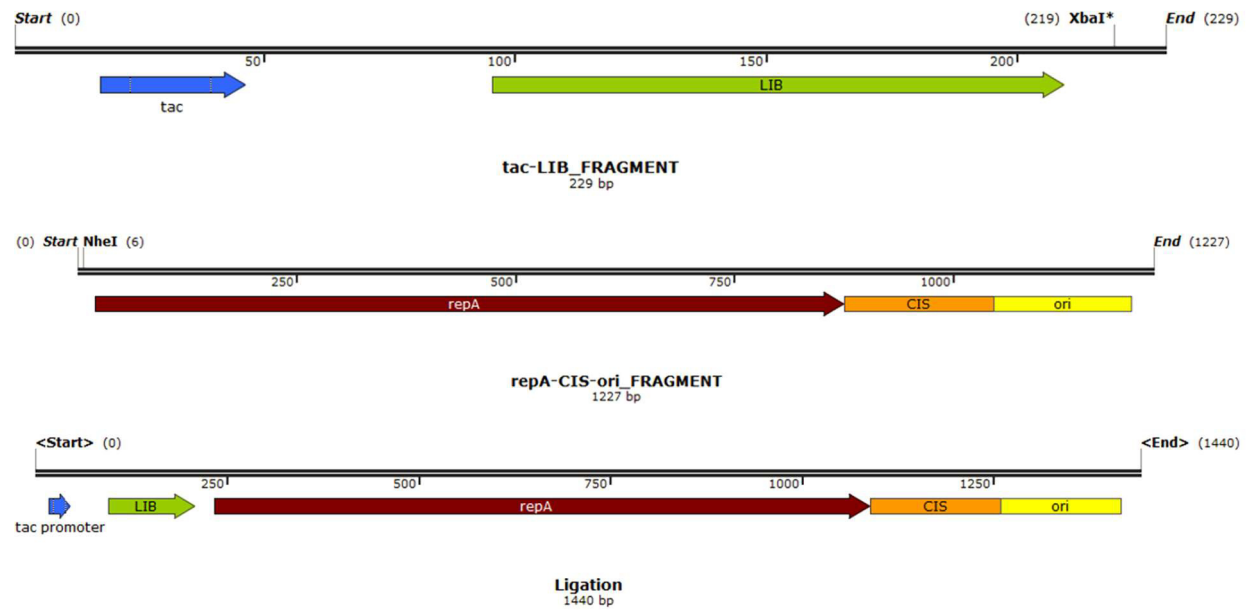
hPin1-WW	<sup>1</sup> MADEEKLPPGWEKRMSRSSGRVYYFNHITNASQWERPSG <sup>39</sup>
hPin1-WW <sub>MUT</sub>	<sup>1</sup> MADEEKLPPGWEKR <del>W</del> SRS-GRVYYFNHITNASQWERPSG <sup>38</sup>
hPin1-WW <sub>MUT</sub> (Bib)	<sup>1</sup> MADEEKLPPGWS <del>X</del> <del>X</del> <del>X</del> WS <del>X</del> <del>X</del> <del>X</del> RVYYN <del>X</del> <del>X</del> <del>X</del> IT <del>X</del> <del>X</del> <del>X</del> QWERPSG <sup>38</sup>



### Expression und Reinigung der WW-Domäne



## Amplifikation von WW-RepA-CIS-ori





## DANKSAGUNG

Danken möchte ich in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Bayer für die Möglichkeit diese Dissertation anfertigen zu können, für sein Vertrauen in mich und die mir zur Verfügung gestellten (wissenschaftlichen) Freiheiten. Außerdem möchte ich mich für die Unterstützung bei der Planung meiner beruflichen Zukunft bedanken, weil es manchmal genügt eine Idee durch Bestätigung wachsen zu lassen.

Danke auch an die aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der AG Bayer sowie aus anderen Arbeitsgruppen des ZMB. Also Danke an Edisa, Dana, Julia, Tina, Anja, Alma, Irina, Peter (Binz), Christoph, Lukas und Gila. Danke auch an Nina für die Bereitstellung der Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen sowie an Ludwig und Jean-Noel für ihre bioinformatische Unterstützung beim Thema Oberflächen. Ich habe in den vergangenen Jahren viel von euch gelernt und hoffentlich auch einiges davon zurückgeben können.

Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern und meiner Schwester für all das, was eine Familie ausmacht. Danke auch für Vertrauen, Motivation, Kritik, Moral, Ermutigung und Entlastung sowie für die Ziele, die ich mit eurer Hilfe erreicht habe. Ohne euch wäre ich jetzt nicht dort, wo ich bin.

Ebenso möchte ich mich bei dem Mann meines Lebens für all das bedanken, was sich mit dem Wort Unterstützung nicht annähernd ausdrücken lässt. Danke vor allem für das Wissen, wie meine Zukunft aussehen soll.

DER LEBENSLAUF IST IN DER ONLINEVERSION AUS GRÜNDEN  
DES DATENSCHUTZES NICHT ENTHALTEN

## ERKLÄRUNGEN

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung humaner Tyrosin-sulfatierter Peptide“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Jennifer Michevec befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des/Doktoranden/in

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des/Doktoranden/in